



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Determinación de la variabilidad genética en tres  
poblaciones de vicuñas (*Vicugna vicugna mensalis*) en  
cautiverio a partir de muestras de heces**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en  
Biología Celular y Genética

**AUTOR**

Juan Manuel AGUILAR LEÓN

**ASESOR**

Blgo. Alberto LÓPEZ SOTOMAYOR

Dr. Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ (Coasesor)

Lima, Perú

2011



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Aguilar, J. (2011). *Determinación de la variabilidad genética en tres poblaciones de vicuñas (Vicugna vicugna mensalis) en cautiverio a partir de muestras de heces*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 16:08 horas del 08 de febrero de 2012, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Biología Celular y Genética** de **JUAN MANUEL AGUILAR LEÓN**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 037-EAPCB-2011, el titulando expuso su tesis: **“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN TRES POBLACIONES DE VICUÑAS (*Vicugna vicugna mensalis*) EN CAUTIVERIO A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: SOBRESALIENTE CON MENCIÓN

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Biología Celular y Genética** a **JUAN MANUEL AGUILAR LEÓN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:34 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 08 de febrero de 2012.

Dra. RINA RAMÍREZ MESÍAS  
(PRESIDENTA)

Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR  
(ASESOR)

Blgo. JOSÉ PINO GAVIÑO  
(MIEMBRO)

Blga. MARIA SILES VALLEJOS  
(MIEMBRO)

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Teófilo y Margarita por todo su apoyo y amor incondicional y por todos sus consejos durante la realización de esta tesis que no es más que la continuación del amor, la motivación y la lucha por mis sueños que supieron inculcar en mí desde el comienzo de mi vida. A mis hermanos Paula y Bernardo a quienes quiero con todo el corazón.

A los doctores Jane Wheeler y Raúl Rosadio que me dieron la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y en especial al Dr. Lenin Maturrano Hernández por toda su ayuda y consejos no solo para la realización de la tesis sino para formarme como persona y profesional.

A los profesores Rina Ramírez, María Siles y José Pino y por supuesto a mi asesor Alberto López por su amistad y apoyo.

A todas las personas de las comunidades de Cala Cala y Picotani por su ayuda en la colecta de las muestras y por permitirnos trabajar con sus animales, al Zoológico “El Parque de las Leyendas” por su ayuda al permitirme trabajar con las vicuñas que ahí viven.

A Jesús Chávez, David Perez y Luchín unas excelentes personas y que se convirtieron en muy buenos amigos para mí.

A mis amigos de toda la vida Cesar, Juanda, Marvic y Palomita y especialmente a Isabel a quien quiero con todo el corazón.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
RESUMEN.....	iv
SUMMARY.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. La vicuña.....	3
2.1.1. Aspectos biológicos.....	3
2.1.1.1. Origen, evolución y taxonomía.....	4
2.1.1.2. Subespecies.....	5
2.1.1.3. Distribución y características ecológicas.....	7
2.1.1.4. Organización social.....	8
a. Grupo familiar.....	8
b. Las tropillas de machos .....	9
c. Individuos solitarios o no diferenciados.....	10
2.1.1.5. Reproducción.....	11
2.1.1.6. Importancia histórica y social de la vicuña .....	12
2.1.1.7. Situación actual de la vicuña.....	13
2.1.2. Conservación.....	14
2.1.2.1. Utilización.....	15
2.1.2.2. Planes de manejo.....	15
2.1.2.3. Amenazas.....	17
2.2. Análisis genético poblacional.....	18
2.2.1. Importancia de la diversidad genética.....	18
2.2.2 ¿Qué es diversidad genética?.....	19
2.2.3. Estimación de la diversidad genética.....	19
2.2.4. Análisis genético en varias poblaciones.....	21

2.2.4.1. Estadísticos F.....	21
2.3. Marcadores moleculares.....	22
2.3.1. Microsatélites.....	22
2.3.1.1. Características de los microsatélites.....	24
2.3.1.2. Clasificación de los microsatélites.....	25
2.3.1.3. Aplicaciones de los microsatélites.....	26
a. Identificación individual y	
pruebas de paternidad.....	26
b. Mapas genéticos y genómica	
comparativa.....	26
c. Estudios en genética de poblaciones.....	27
2.4. Técnicas genéticas no invasivas.....	27
2.4.1. Análisis moleculares usando material no invasivo.....	29
2.4.2. Análisis genéticos de poblaciones de vicuñas.....	29
2.4.3. Trabajos realizados usando microsatélites.....	31
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
3.1. Hipótesis.....	33
3.2. Objetivos.....	33
3.2.1. Generales.....	33
3.2.2. Específicos.....	33
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1. MATERIALES.....	34
4.1.1. Poblaciones de estudio.....	34
4.1.2. Transporte de muestras y lugar de	
estudios.....	35
4.2. METODOLOGÍA.....	35
4.2.1. Colecta de muestras no invasivas.....	35
4.2.2. Extracción de ADN.....	37

4.2.3. Análisis mediante la Reacción de la Cadena	
de Polimerasa (PCR).....	38
4.2.4. Electroforesis.....	40
4.2.5. Secuenciamiento y determinación	
de microsatélites (alelos).....	40
4.2.6. Análisis estadístico y determinación de	
variabilidad genética.....	40
V. RESULTADOS.....	41
VI.DISCUSIÓN.....	53
VII.CONCLUSIONES.....	58
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	59



## RESUMEN

Se evaluó la diversidad genética de las poblaciones de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*) en cautiverio de las localidades de Picotani, Cala Cala (Puno) y el Parque de la Leyendas (Lima) utilizando muestras no invasivas como son las heces. Dichas poblaciones fueron analizadas con 11 microsatélites específicos para Camélidos Sudamericanos (CSA) reportados por Lang (1996) y Penedo (1998) mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) múltiple.

Para la realización de este trabajo los productos de la PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y luego secuenciados en los laboratorios Macrogen Inc. (Korea). El análisis de las secuencias se efectuó en el programa Genoprofiler 2.0. Todos los cálculos y procedimientos del análisis estadístico se efectuaron empleando los programas GENEPOP v3.1 (Raymond y Rousset, 1995) y GENETIX v4.0 (Belkhir). Los niveles de heterocigosidad esperada variaron entre 0.48 (Cala Cala) y 0.58 (Picotani) para las 3 poblaciones y de 0.039 (Cala Cala) hasta 0.875 (Parque de Las Leyendas) para todos los Loci. Se encontró valores Fis altos para la población del Parque de las Leyendas y Picotani lo que indica problemas de consanguinidad en esta población. Los valores de Fst fueron de 0.103 y Fit de 0.139 e indican una diferenciación genética considerable entre estas tres poblaciones.

Estos datos sugieren que el análisis de microsatélites a partir de heces es una técnica eficiente y reproducible y que el sistema de manejo en cautiverio está afectando la diversidad genética de las vicuñas y probablemente Picotani y Cala Cala serán muy pronto un solo grupo genético.

**Keywords:** Diversidad genética, PCR, Heterocigosidad, loci, deriva genética, valores *Fst*.

## SUMMARY

The present study evaluated the genetic diversity of captive vicuñas (*Vicugna vicugna mensalis*) in three localities Picotani, Cala Cala and “El Parque de Las Leyendas” using noninvasive fecal samples. The populations were analyzed using 11 specific microsatellite for South American Camelids (CSA) Lang 1996, Penedo 1998, and by PCR (polymerase Chain Reaction).

The amplified products were separated on agarose gels at 2%, sequenced at Macrogen Inc. (Korea) and analyzed using Genoprofiler 2.0. All calculations and statistical analyses were performed using GENEPOP v3.1 (Raymond and Rousset, 1995) and GENETIX v4.0 (Belkhir). Expected heterozygosity levels vary between 0.48 (Cala Cala) and 0.58 (Picotani) for the three populations, and 0.039 (Cala Cala) to 0.875 (Parque de Las Leyendas) for all loci. High  $F_{is}$  values were found for Picotani and Parque de las Leyendas, indicating problems of inbreeding in this populations.  $F_{st}$  values were 0.103 and  $F_{it}$  values were 0.139 this indicated a considerable differentiation between this three populations.

These data suggest that microsatellite analysis from feces is an efficient and reproducible technique and that the captive management system are affecting the genetic diversity of vicuñas moreover Cala Cala and Picotani will probably be a single genetic group.

**Keywords: Genetic diversity, PCR, Heterozygosity, loci, genetic drift,  $F_{st}$  values.**

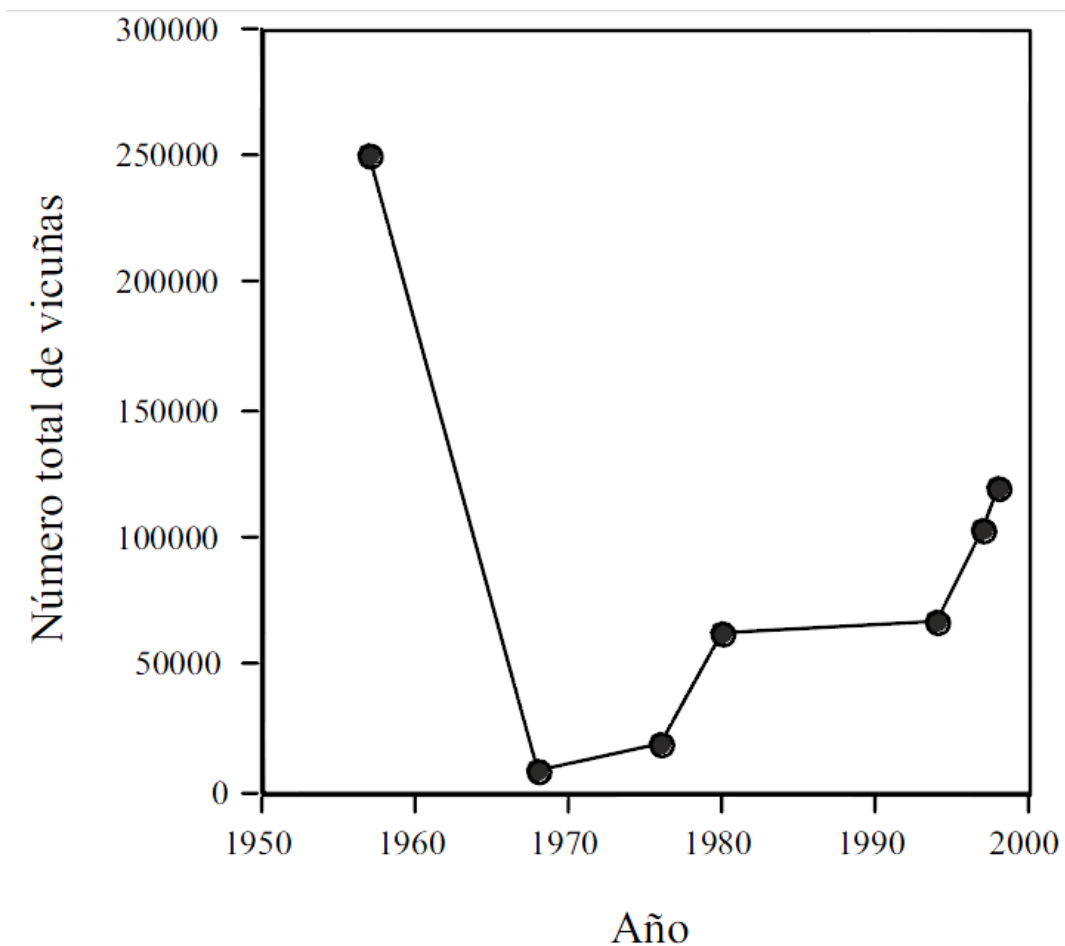
# I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se reconocen cuatro camélidos sudamericanos (CSA), dos de ellos son considerados especies silvestres: el guanaco y la vicuña (Kadwell *at al.*, 2001). El más reciente censo para vicuñas realizado en 2000 estimó una población de 118 678 individuos, ocupando un área menor a 7 millones de hectáreas. La vicuña tiene una de las fibras más finas del mundo, constituye una importante fuente de ingreso para un sector de la población cada vez más marginada y con menos oportunidades de superación. Así, la vicuña constituye un recurso invaluable para las poblaciones campesinas del Perú y otros países como Bolivia, Norte de Chile y Argentina (Lichtenstein, 2002; Hoces, 2008).

La vicuña, *Vigugna vicugna* (Molina, 1782) ha sufrido una pérdida de diversidad genética a lo largo del tiempo (Wheeler *at al.*, 2001), primero con la llegada de los españoles (1535 – 1810), etapa durante la cual fue cazada indiscriminadamente para comercializar subproductos derivados de ella. Esto mermó la población considerablemente. Finalmente, la caza furtiva alrededor de los años cincuenta también supuso un duro golpe para la población de vicuñas (Yacobaccio *et al.*, 2003). No es hasta el año 1964, etapa en la que se promueven proyectos de conservación, como la creación de la Reserva de Pampa Galeras en el año 1967, que la vicuña logra recuperarse de la casi extinción.

Desde 1996 el gobierno peruano implementó la utilización de Módulos de Uso Sustentable (MUS) como un programa de manejo en cautiverio de las vicuñas para así facilitar su monitoreo y reducir la caza furtiva de animales. Si bien las vicuñas lograron recuperarse satisfactoriamente (Figura 1), se ha estudiado poco acerca del impacto del uso de los MUS sobre el material genético de las vicuñas (Lichtenstein, 2002).

Es por esto que existe la gran necesidad de realizar un estudio que enfoque cómo la diversidad genética de las vicuñas se ve afectada, especialmente en lugares donde no se encuentran en estado silvestre. Se ha aplicado sistemas de cercos debido a los riesgos de aumento en la consanguinidad, los cuales pondrían en riesgo la diversidad genética de la especie y, en consecuencia, la de un recurso genético invaluable para el país. Un estudio en este campo también permitirá introducir mejoras en cuanto al futuro manejo y conservación de estas poblaciones.



**Fig 1.** Evolución de la población peruana de vicuñas. Fuente: Hofmann *et al.*, 1983.  
*El manejo de la vicuña silvestre.*

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. La vicuña

La vicuña (*Vicugna vicugna*) es uno de los cuatro camélidos presentes en nuestro país. Poseemos el 61.46% de la población mundial de vicuñas lo que nos permite hacer un uso sostenible del recurso, el buen manejo y aprovechamiento de su fibra mediante Comités de Manejo que ejecuten acciones de conservación y protección de la especie, incrementando su población para mejorar la calidad de vida de las familias que viven en las zonas más alejadas en la región andina (Wheeler y Hoces, 1997; CONACS, 2006).

#### 2.1.1. Aspectos biológicos

La vicuña habita en la puna alto andina de Perú, Bolivia, Chile, Argentina y Ecuador, aproximadamente entre los 3.000 y 4.600 m.s.n.m y es el más pequeño y frágil de los camélidos sudamericanos (Hoces, 1995).

La vicuña está adaptada ecológicamente a la Puna y su crianza ofrece las siguientes ventajas:

- a) Mejor aprovechamiento de las praderas nativas y sin producir un impacto negativo por pisoteo sobre los suelos.
- b) Ser una especie silvestre que no requiere cuidado permanente del rebaño, tratamientos sanitarios o alimentación suplementaria como los animales domésticos (Linchestein, 2002).

La Puna es una planicie de altura, seca (con lluvias estacionales de aproximadamente 300 mm anuales) y fría. La vegetación se describe principalmente como una estepa xerófila y presenta fenotipos adaptados a condiciones extremas de sequía, alta diafanidad, frío y viento. Estas adaptaciones de la vegetación inciden en sus características de digestibilidad para los ungulados de la zona. Las vicuñas poseen

adaptaciones fisiológicas y etológicas asociadas al uso de este tipo de vegetación y se considera que realizan un “pastoreo de bajo impacto” si se las compara con el ganado introducido. Algunas de estas adaptaciones son las siguientes:

- a) Las vicuñas no arrancan el pasto sino que lo cortan con los incisivos superiores, los cuales tienen crecimiento continuo y una capa de esmalte del lado labial que los mantiene afilados. Esto permite aprovechar pastos muy cortos y partes basales fuera del alcance de otros ungulados (Hofmann *et al.*, 1983).
- b) Pueden realizar una selección más fina de partes de las plantas porque tienen labios hendidos que le permiten mayor manipulación del vegetal (Hofmann *et al.*, 1983).
- c) El alimento permanece más tiempo en el estómago permitiendo una fermentación más prolongada y una mejor absorción (Hofmann *et al.*, 1983).
- d) Anatómicamente, las patas de las vicuñas terminan en yemas blandas que cubren la tercera y cuarta falange, esto les permite un caminar seguro sobre las superficies rocosas y no origina destrucción del suelo delgado (Vilá, 1999).
- e) Tienen mayor afinidad por el oxígeno y mayor función tisular a menores presiones parciales de oxígeno (Vilá, 1999).

#### 2.1.1.1. Origen, evolución y taxonomía

La vicuña pertenece a la familia *Camelidae*, cuyos ancestros tuvieron su origen en los grandes llanos de América del norte durante el Eoceno hace 40 ó 45 millones de años (MA), y es en esos momentos cuando ocurrió la división entre las tribus Lamini y Camelini hace 14 MA, correspondientes a los camélidos del nuevo y viejo mundo respectivamente. Posteriormente, hace 3 MA, la tribu Camelini inicia la migración hacia Asia y Europa, a través del puente del estrecho de Bering, dando origen a los camélidos del viejo mundo: el camello (*Camelus bactrianus*) y el dromedario (*Camelus dromedarius*). Por la misma época emigraron individuos de la tribu Lamini hacia

América de Sur durante la época del gran intercambio, y donde se originaron los géneros *Lama* y *Vicugna* hace 2 MA (Egey y Miragaya 2006; Marín *et al.*, 2007).

Dos ramas de la tribu Lamini evolucionaron del género ancestral norteamericano *Pleiolama* (11-9 MA) (Webb y Meachen, 2004). La primera de distribución exclusivamente norteamericana, contiene *Alforjas* (10-4.5 MA) y *Camelops* (4.5 – 0.1 MA), mientras que la segunda contiene a *Hemiauchenia* (10-0.1 MA), *Palaeolama* (2-0.1 MA), *Lama* (2 MA - tiempo presente) y *Vicugna* (2 MA- tiempo presente), todos estos géneros presentes en América de Sur. Al final del pleistoceno, hace 10 a 12 mil años, *Camelops*, *Hemiauchenia* y *Palaeolama* desaparecieron, quedando *Lama* y *Vicugna* como los únicos sobrevivientes de la tribu Lamini (Marín *et al.*, 2007).

#### 2.1.1.2. Subespecies

En la actualidad se puede dividir a la vicuña en dos grandes poblaciones. La primera habita en la Puna húmeda a grandes alturas, al Norte de la Diagonal seca que conforma el taxón descrito como *Vicugna vicugna mensalis* (Fig. 2) y la segunda más pequeña y relativamente aislada que habita a una menor altura en la Puna dentro de la Diagonal Seca la cual corresponde a *Vicugna Vicugna vicugna* (Fig. 3) (Marín *et al.*, 2007).

De las dos subespecies existentes, la más estudiada es la vicuña norteña, *V. v. mensalis*, con su “color vicuña” y mechón pectoral. La coloración de su pelaje es marrón canela en la parte dorsal, lateral del cuerpo a lo largo del cuello y la porción dorsal de la cabeza. El pecho, vientre, y el sector interno de las patas, al igual que la parte inferior de la cabeza, son blancos. La punta de la cola y el sector ventral de la misma son de color blanco. La longitud promedio del vellón en animales adultos es de 3.28 cm, y el largo del mechón pectoral alcanza a medir entre 18 y 20 cm. El diámetro promedio de la fibra del vellón es de  $12.52 \pm 1.52 \mu\text{m}$  (Hoyos, 2009).



**Fig 2.** *Vicugna vicugna mensalis*. Comunidad de Picotani, Puno-Perú.

Foto: Juan M. Aguilar, 2008.



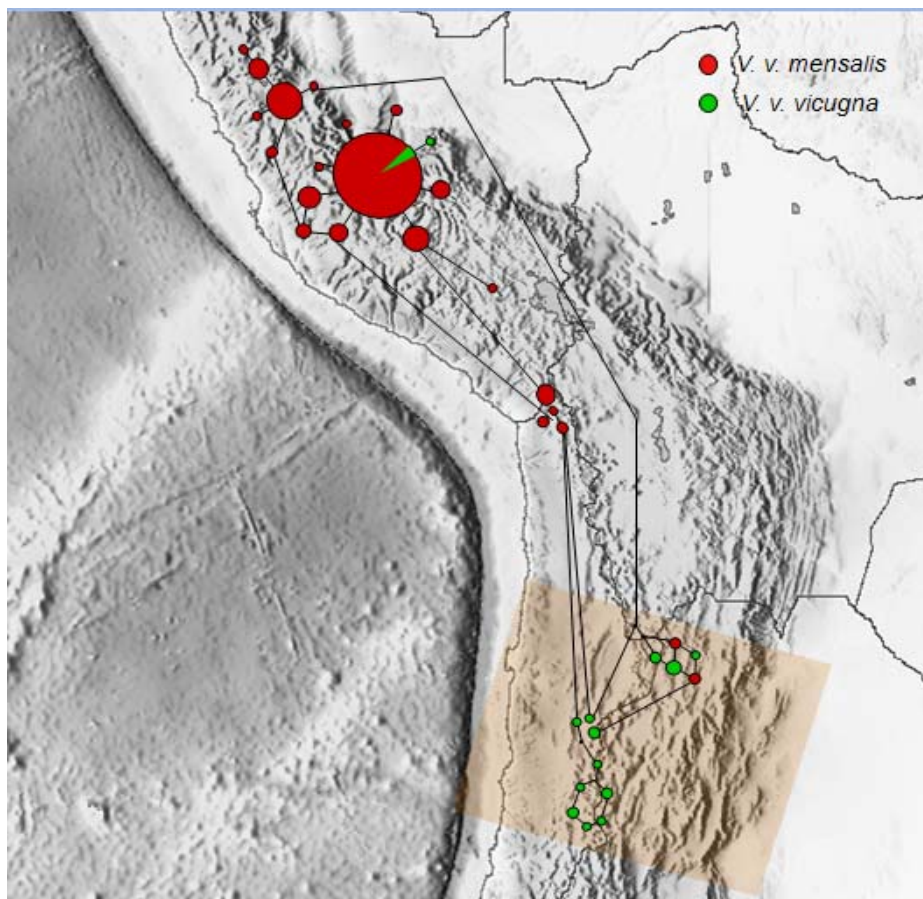
**Fig 3.** *Vicugna vicugna vicugna*, Jujuy-Argentina.

Foto: B. Vilá



### 2.1.1.3. Distribución y características ecológicas

La vicuña está limitada a áreas de gran elevación entre los 9° 30' 29" latitud Sur en los Andes (Marín *et al.*, 2007). Los camélidos silvestres presentan hoy una distribución en parches provocada por la cacería descontrolada y el deterioro de su hábitat natural. Se ha fijado como límite tentativo entre las dos subespecies de vicuñas el paralelo 18° S. Aunque no se dispone de información acabada sobre distribución y abundancias a nivel sub-específico, se considera que todas las vicuñas del Perú, las del altiplano norte, centro y parte del altiplano sur de Bolivia y las de la región de Tarapacá en Chile pertenecen a la subespecie norteña (Fig. 4) (CONACS, 2006).



**Fig.4** Distribución geográfica de las dos subespecies de *Vicugna vicugna*. (Marín, *et al.*, 2007)

Las vicuñas no presentan dimorfismo sexual significativo. En estudios realizados en 50 hembras y 50 machos de *V. v. mensalis*, de 1 año y medio a 6 años y medio procedentes de Pampa Galeras (Ayacucho), la alzada a la cruz fue de 86.50 cm para hembras y 90.43 cm para machos. Asimismo, los promedios de longitud total fueron de 96.33 cm en las hembras y 110.73 cm en los machos, con pesos promedios de 33.24 kg y 36.22 kg para hembras y machos respectivamente. Sin embargo, existen discrepancias en relación con las medidas de longitud total, pues Hofmann *et al.* (1983) reportan cifras de 137 a 181 cm en animales adultos procedentes de la misma área mientras otros autores dan cifras de 144 a 175 cm. En relación con el peso vivo cabe destacar que algunos autores mencionan pesos superiores a los reportados por Paucar *et al.* (1984), que van desde los 30 kg hasta los 65 kg (Hoyos, 2009).

Estudios de ADN nuclear (microsatélites) y mitocondrial realizados en muestras de vicuñas procedentes de todo el rango de su distribución actual en Sudamérica confirman la separación en dos subespecies y demuestran una relación ancestral entre *V. v. mensalis* y su forma doméstica, la alpaca (*Vicugna pacos*) (Kadwell *et al.*, 2001; Marín *et al.*, 2007).

#### 2.1.1.4. Organización social

Las vicuñas son territoriales y su organización social se basa en grupos familiares muy estables y grupos de solteros muy variables en composición y distribución, con estructuras laxas, siendo comunes las fusiones y fisiones de los mismos (Vilá, 2002).

#### **A. GRUPO FAMILIAR**

La composición de los grupos familiares es bastante fija, inclusive en la comparación inter-poblacional. La familia "promedio" está compuesta por un macho, tres a cuatro hembras y dos crías (Fig. 5). Los machos son los encargados de mantener el número de animales en su grupo familiar y de evitar que sus hembras se puedan cruzar con otros machos. Esto se logra a partir del comportamiento agresivo, iniciado

principalmente por los machos reproductores. Cuando los machos solteros son los receptores de la agresión, generalmente ésta finaliza con una fuerte corrida y un alejamiento muy distante de los solteros (inclusive pueden desaparecer varios días de la zona de estudio). Se ha estimado que machos de 3-4 años pueden defender su territorio por lo menos por seis años. Esta persistencia del macho con sus hembras es muy particular de la especie y bastante atípica dentro de los mamíferos (Vilá, 2002).



**Fig. 5** Grupo familiar de *V.v. mensalis* en Pampas Galeras.

Foto: Hugo Valls

#### **B. LAS TROPILLAS DE MACHOS**

Compuesto por todos los grupos de machos no territoriales. Las tropillas de machos solteros (de 1 a 4 años de edad) están constituidas por cinco a 50 individuos. Estos no son tolerados en hábitats ocupados y son rápidamente espantados fuera por los machos territoriales. Estos grupos de machos viven en territorios no ocupados o no preferidos. Debido a que son constantemente ahuyentados se desplazan largas distancias en busca de áreas donde alimentarse sin ser perturbados. Las tropillas de

machos tienen un valor muy importante pues aseguran el vigor de la población (Franklin, 1974; Lichtenstein, 2002).



**Fig. 6** Tropilla de machos en Pampa Galeras.

Foto: Hugo Valls

### **C. INDIVIDUOS SOLITARIOS O NO DIFERENCIADOS**

Una vicuña que va sola puede ser un adulto macho sin territorio o un adulto macho con territorio, pero sin hembras. Puede tratarse también de un antiguo líder que ha sido desplazado de su territorio por un nuevo macho. Este tipo de individuos también son unidades no reproductoras (Franklin, 1974).





**Fig. 7.** Individuo solitario en la comunidad de Cala Cala, Puno-Perú.

Foto: Juan M. Aguilar

#### **2.1.1.5. Reproducción**

El período de gestación de la vicuña varía entre 330 y 350 días (Franklin, 1974). La parición comienza durante la segunda quincena de febrero y termina la primera semana de abril, con la mayoría de nacimientos en marzo. Las crías siempre nacen durante la mañana con peso correspondiente al 15% del peso vivo de la madre (4 - 6 kg). El empadre ocurre unas semanas después de la parición. Algunas vicuñas están listas para el empadre al año de edad, pero la mayoría entra a los dos años y producen su primera cría a los tres años. Las tasas de preñez, determinadas con base en observación externa en el último mes de gestación en Pampa Galeras antes de la crisis poblacional fueron de 85% a 95%, y 58% después de la crisis (Hoyos, 2009). Tasas de preñez de 99% determinadas por palpación rectal, han sido reportadas en una población de vicuñas de Puno (Novoa, 1989).

Durante los primeros 4 meses de vida las crías sufren una mortalidad que varía entre 10% y 30%. De acuerdo a las informaciones reportadas por Hofmann *et al.* (1983), las

principales causas de mortalidad en crías hasta dos meses de edad en Pampa Galeras son neumonías aparentemente producidas por hipotermia (35-40%), caza ilegal (40%) y depredación por zorro, puma y cóndor (20%). En animales de 3 a 6 semanas de edad son frecuentes las diarreas causadas por infección de *Escherichia coli*. La enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens*, principal causa de mortalidad en crías de alpaca a esta edad, nunca ha sido encontrada en vicuñas de Pampa Galeras. Entre las enfermedades reportadas en vicuñas adultas necropsiadas en Pampa Galeras se puede anotar actinomicosis y osteomielitis (pocos casos), sarcosistiosis (común), parasitosis gastrointestinal (moderado) y sarna (casos aislados) (Hofmann *et al.*, 1983). La baja incidencia de enfermedades se debería principalmente al hábito de utilizar estercoleros que previenen focos de infección en el medioambiente. En otro estudio realizado en Pampa Galeras, se reportó como causas de mortalidad en la población adulta: depredación (54%), rayos (26%), y un 20% a causa de la hipotermia, infección no especificada, inanición y causas no determinadas (Hoyos, 2009).

#### 2.1.1.6. Importancia histórica y social de la vicuña

La vicuña tiene una larga asociación con las sociedades humanas y se estima que los primeros habitantes de América del Sur se relacionaron con este camélido hace 11000 años. Los cazadores recolectores utilizaban la carne de vicuña para alimentarse, los huesos para hacer instrumentos y las pieles para vestirse (Lichtenstein, 2002).

En los tiempos incaicos la captura de vicuña estaba severamente reglamentada. Durante el Incanato existían en el Perú gran número de vicuñas eficientemente manejadas por los incas por el sistema de Chaku o rodeo cada 3 ó 4 años (Fig. 8). La fibra obtenida era usada por el inca y la nobleza para hacer prendas. Se estima que a la llegada de los españoles existían 2 millones de vicuñas en el Perú (Lichtenstein, 2002).



Fig. 8 Chaku realizado en la comunidad de Picotani, Puno – Perú.

Foto: Juan M. Aguilar

#### 2.1.1.7. Situación actual de la vicuña

Perú tiene la mayor población de vicuñas del mundo, distribuida a lo largo de su territorio altoandino. Según el último censo nacional, en el año 2000 se había alcanzado los 118 678 individuos sobre cerca de 7 millones de hectáreas, población que proyectada al año 2006 estima unos 188 000 ejemplares, distribuidos en 16 departamentos desde Cajamarca por el Norte hasta Tacna por el Sur, excluyendo unos 1,000 - 1,200 individuos por año, eliminados por caza furtiva, frente al incremento poblacional proyectado de 8% al 12% anual a partir de los censos. Las mayores densidades poblacionales de vicuñas siguen concentrándose en los departamentos de Ayacucho (que incluye la Reserva de Pampa Galeras con 5,500 ejemplares), Junín, Puno y Lima (Hoces, 2008).

En Chile, las vicuñas se encuentran en el área Noreste del país abarcando las zonas de Tarapacá, Antofagasta y parte de Atacama. En Argentina todavía no se ha hecho un censo a nivel nacional, encontrándose vicuñas en las provincias de Jujuy, Catamarca, La Rioja y San Juan. En Bolivia se encuentran a lo largo del altiplano Sudoeste y su último censo nacional registró una población de 33 844 vicuñas en un área de 3.428.356 ha. Ecuador es un caso particular pues en 1988 recibió vicuñas como producto de donaciones de Perú, Chile y Bolivia; en este momento tiene 912 vicuñas (Lichtenstein, 2002).

### **2.1.2. CONSERVACIÓN**

En el año 1964 quedaban en Perú entre 5,000 y 10,000 vicuñas debido a la caza por su valiosa fibra y a la competencia con el ganado doméstico (Lichtenstein, 2002). Ese año comenzó el Proyecto de cooperación belga con el Ministerio de Agricultura y en 1966 se firmó un Convenio entre el Ministerio de Agricultura y la comunidad de Lucanas con el objetivo de establecer la Reserva Nacional Pampa Galeras en el área donde existía el mayor número de vicuñas del país. A partir de 1972 la Reserva recibió apoyo de la República Federal de Alemania a través del Proyecto de Cooperación técnica con la Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). Este proyecto, fruto de su época, se centró en la conservación de la especie priorizando el aspecto biológico del manejo de la vicuña por sobre la dimensión social. Es a partir de aquí que se logró un efectivo crecimiento de la población de vicuñas alcanzando una población aproximada de 180 000 individuos (Lichtenstein, 2002).



#### 2.1.2.1. Utilización

La vicuña es un animal silvestre de fácil captura, manipulación y esquila y que permite manejo sustentable de animales silvestres, dado que se esquilan vicuñas vivas que luego son liberadas. Este camélido silvestre posee una de las fibras más finas del mundo (alrededor de 12.5 micrones) y más cotizada en el mercado internacional (300-500 USD por kilo), siendo su único competidor en finura el chiru (*shahtoosh*) que ostenta 10-12 micrones (Bolkovic y Ramadori, 2006).

Los países andinos han desarrollado distintas modalidades de manejo de vicuñas de acuerdo a sus características particulares como: organización social, idiosincrasia, sistemas de producción, sistema de tenencia de la tierra y de los recursos naturales, y legislación. En el caso de Perú y Bolivia, los planes de manejo fueron diseñados inicialmente para que comunidades territoriales hicieran uso de las vicuñas que se encontraran en sus tierras comunales mediante capturas temporales seguidas de la liberación de los animales. En Chile existe un sistema mixto de manejo en silvestría por comunidades aimara y en grandes corrales. En el caso de Argentina, donde existe una ausencia de estructuras comunales asociada a la propiedad de la tierra y los núcleos de producción económica son las unidades domésticas, se diseñó un sistema de manejo en cautiverio llevado a cabo por pequeños productores. La "privatización" del manejo de este recurso natural coincidió con el período histórico en el que se privatizaron la mayoría de los servicios públicos en el país (década del '90) (Lichtenstein, 2002).

#### 2.1.2.2. Planes de manejo

MODELO DE SEMI-CAUTIVERIO O CAUTIVERIO: El manejo de las vicuñas en el Perú se viene realizando mediante un modelo de "semicautiverio" desde 1996, cuando el gobierno implementó la utilización de Módulos de Uso Sostenible o MUS que son corrales de 1000 ha con cercos de malla metálica de aproximadamente 2 metros de altura. La iniciativa fue propiciada por el CONACS para el Perú con el objetivo de

mantener a la vicuñas seguras, libres de los cazadores y facilitar su monitoreo y, según CONACS, mejorar la eficiencia de la captura (Lichtenstein, 2002). Si bien el tamaño de los corrales es considerable, desde el punto de vista etológico, se generan al menos dos problemas importantes. 1) Por la falta de posibilidades de dispersión de los animales y los problemas de consanguinidad que se pueden presentar y 2) la dinámica social de las tropas de solteros. Los animales solteros cumplen un papel fundamental en la estructura reproductora de las vicuñas ya que son una de las mayores presiones de selección que deben enfrentar los machos territoriales. De manera indirecta los solteros están permanentemente poniendo a prueba las habilidades y fortalezas de los machos familiares y por lo tanto el flujo de genes en la población. Los machos solteros muchas veces son agredidos y escapan a gran distancia de las zonas de los grupos familiares, permaneciendo ausentes a veces por varios días. Esta posibilidad es inexistente en los corrales y los disturbios agresivos generados por la presencia de solteros que no pueden escapar debe ser tomada en cuenta. Cuando especialistas peruanos son consultados al respecto muchas veces sugieren una saca de machos y dejar un 20% en los corrales. Esto debilitaría completamente la estructura social e inclusive podría generar agresividad de machos territoriales con sus hembras. A su vez significaría la existencia de selección artificial y por lo tanto las vicuñas perderían su cualidad de silvestres (Vilá, 1999).

MODELO DE CRIADEROS: En este modelo se propicia la creación de criaderos privados aun en zonas donde no es oriunda la vicuña (ej. Zonas cercanas a la capital de la provincia de Catamarca, Argentina). Los dueños de los criaderos pueden no ser pobladores locales y los beneficios económicos son para quien ha realizado la inversión de capital en infraestructura. Desde el punto de vista biológico los cambios de los animales debido al manejo intensivo serían irreversibles. En los criaderos se castran y separan machos solteros alterando, en consecuencia, la organización social de la especie, esto se suma a los problemas sanitarios (sarna, actinomicosis, queratoconjuntivitis) que aumentan por la cercanía de los animales en criaderos y que

generan la necesidad de técnicos en sanidad. Los animales están sometidos a manejo intensivo con amansamiento y control de los machos reproductores en un modelo de explotación comercial pecuario. Este modelo de explotación conlleva un proceso de domesticación, siendo de consenso internacional que no se debe propiciar la pérdida de silvestría. Esto es especialmente aplicable al caso de la vicuña ya que cabe recordar que ya existen dos especies domesticas de camélidos, la llama y la alpaca, que resultaron del proceso de selección artificial de la vicuña y el guanaco. Por lo tanto, a largo plazo, parece más razonable utilizar en forma sostenida las especies ya domesticadas en lugar de volver a comenzar el proceso de domesticación de los camélidos silvestres (Vilá, 1999).

MODELO DE USO DE POBLACIONES SILVESTRES: Este modelo se basa en el seguimiento de poblaciones silvestres y esquilas periódicas con suelta inmediata puesto que es el más indicado desde el punto de vista de la viabilidad biológica de la población. En este momento está siendo llevado a cabo en Bolivia y Chile y en algunas comunidades del Perú (Lichtenstein, 2002). Este modelo se inició en Chile en 1975 y recientemente ha incorporado estudios de bienestar animal para rediseñar técnicas de menor estrés de captura y esquila. Si bien los trabajos de bienestar animal son importantes en cualquier sistema de manejo, es en estos casos de silvestría en los que son más importantes. Se ha trabajado intensamente en las mediciones fisiológicas de indicadores de estrés y se han diseñado nuevos métodos de captura y esquila (Bonacic *et al.*, 2006).

#### 2.1.2.3. Amenazas

Las amenazas más importantes que pesan sobre la sobrevivencia de la vicuña comprenden a la caza ilegal (Figura 9), la competencia creciente con las llamas y las alpacas domésticas por las pasturas y la falta de fondos para las actividades de conservación a largo plazo. La caza ilegal se ha incrementado en Bolivia y Perú,

desbordando las posibilidades de control de las autoridades, particularmente en las zonas donde la guerrilla se ha intensificado. El aparente aumento reciente de la población de vicuña, como resultado de la protección, hará difícil la conservación a largo plazo de la especie a menos que la gente en cuyas tierras viven las vicuñas pueda percibir algunos beneficios de ello. El mal tiempo y la depredación por el puma (*Felis concolor*), son también citados como freno para la reaparición de la vicuña en ciertas zonas (FAO, 2005).



**Fig. 9.** Matanza de 150 vicuñas juveniles y preñadas en 2009 por cazadores furtivos en la comunidad alto andina de Huancabamba, Apurímac (Foto "El Comercio", 2009).

## **2.2. Análisis Genético Poblacional**

### **2.2.1. Importancia de la diversidad genética**

Mantener la diversidad genética es uno de los aspectos más importantes en la biología de la conservación. Primero, los cambios medio ambientales son un proceso continuo en la naturaleza y la diversidad genética es un requisito de las poblaciones para poder adaptarse a dichos cambios. Segundo, la pérdida de la diversidad genética es asociada con endogamia y una reducción del *fitness* reproductivo. Es por esto que la

IUCN reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética como una de las tres prioridades globales para la conservación (Reed y Frankham, 2003).

### **2.2.2. ¿Qué es diversidad genética?**

La diversidad genética se ve reflejada en las diferencias de caracteres entre individuos como, por ejemplo, el color de los ojos, la piel y el cabello en humanos; color y patrón de bandas en las conchas del caracol; color de las flores en las plantas; secuencias de proteínas y del ADN. Así también la diversidad genética se evidencia en los procesos de evolución y selección de la especie, por ejemplo, la gran variedad de razas de perros todas derivan del lobo gris (*Canis lupus*). Empezando con el lobo, la selección basada en fenotipos produjo razas de diferente tamaño (San Bernardo, versus chiguagua), comportamiento (Pastor alemán, Fox terriers, perros de caza como los Pontiers, perros de caza acuáticos como los labradores, perros ovejeros, etc.), forma (Bulldogs, Dachshunds o perro tejón), etc. Estas diferencias genéticas reflejan tanta diversidad genética dentro del ancestro y nuevas mutaciones que aparecen durante la selección (Reed y Frankham, 2003).

Los genes son secuencias de nucleótidos en un segmento particular (locus) del ADN. La diversidad genética presenta secuencias ligeramente diferentes. A su vez, las variantes de las secuencias del ADN pueden resultar en secuencias de aminoácidos diferentes en la proteína codificada por el locus. Esta variación en la proteína puede resultar en diferencias bioquímicas o morfológicas que causan diferencias en el rango reproductivo, la sobrevivencia o comportamiento de los individuos (Reed y Frankham, 2003).

### **2.2.3. Estimación de la diversidad genética**

Una de las estimaciones más simples para cuantificar la diversidad genética es estimar la diversidad alélica (designada como  $A$ ), que es simplemente el número

promedio de alelos por locus. Aunque es un método sencillo es muy sensible al tamaño de la muestra, lo que significa que el número de alelos identificados dependerá, en parte, del número de individuos muestreados. La segunda medida de diversidad es la proporción de loci polimórficos (designada como  $P$ ). Esta puede ser de utilidad en estudios basados en loci que no tienen mucha variación como las aloenzimas y, al igual que la diversidad alélica, es también muy sensible al tamaño muestral. Además, en estudios con microsatélites (que son marcadores altamente variables) este índice no proporciona mucha información pues estos son escogidos para análisis solo si son polimórficos, por consiguiente, se encontrarán valores de  $P$  altos. Una tercera medición de la diversidad genética (también influenciada por el tamaño poblacional muestreado) es la Heterocigosidad observada ( $H_o$ ), que se obtiene dividiendo el número de heterocigotos en un locus particular por el número total de individuos muestreados. Aunque una o más de estas estimaciones son incluidas muchas veces en estudios de diversidad genéticos, estos son generalmente apoyados por una medida alternativa conocida como diversidad genética ( $h$ ; Nei, 1973). La ventaja es que esta alternativa es mucho menos sensible que los otros métodos al tamaño muestral. Gene Diversity es calculada como:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m X_i^2$$

Donde  $X_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ , y  $m$  es el número de alelos que se encontraron en ese locus. Se debe notar que la única información para calcular gene diversity son las frecuencias alélicas dentro de la población, para cualquier locus dado,  $h$  representa la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes uno del otro. En una población con cruzamientos al azar,  $h$  es equivalente a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y representa la frecuencia de heterocigotos que se debería esperar si la población estuviera en equilibrio de Hardy Weimberg. Por esta razón,  $h$  es a menudo representado por  $H_e$ . La mayoría de los cálculos de  $H_e$  son basados en loci múltiples, en cuyo caso  $H_e$  es calculado por cada locus y luego

promediado con todos los loci presentes para presentar una aproximación simple de diversidad por cada población (Freeland, 2005).

## **2.2.4. Análisis genético en varias poblaciones**

### **2.2.4.1. Estadísticos F**

El método más usado para cuantificar diferenciación genética entre poblaciones es mediante los estadísticos F, desarrollados por Wright (1951). Los índices F usan el coeficiente de consanguinidad para describir la división de la variación genética dentro y entre las poblaciones y pueden ser calculados en tres niveles diferentes.

El primero es el índice *Fis*, que mide el grado de consanguinidad en una población relacionándolo con el resto de las sub-poblaciones. Esto refleja la probabilidad de que dos alelos dentro del mismo individuo sean idénticos por descendencia. El índice *Fis* es calculado como:

$$Fis = (Hs - Hi) / Hs$$

Donde: *Hi* es la heterocigosidad observada en la subpoblación estudiada y *Hs* es la heterocigosidad esperada en la subpoblación.

El segundo estadístico F es *Fst* (también conocido como índice de fijación), y provee un estimado de la diferenciación genética entre subpoblaciones. Es una medida del grado de consanguinidad dentro de una subpoblación relacionada con el total de la población (entendiendo el total de la población como todas las subpoblaciones juntas), refleja la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar de dentro de una subpoblación sean idénticos por descendencia. Es calculado como:

$$Fst = (Ht - Hs) / Ht$$

Donde: *Hs*, como vimos, es la heterocigosidad esperada y *Ht* es la heterocigosidad esperada total de la población.

El índice *Fit* se usa con menos frecuencia que los otros dos antes mencionados. Este provee un coeficiente de endogamia general para un individuo midiendo la heterocigosidad de un individuo en relación con la población total. El índice *Fit* es por lo tanto influenciado por cruces no al azar dentro de una población (*Fis*) y la subdivisión poblacional (*Fst*) , se calcula como:

$$Fit = (Ht - Hi) / Ht$$

Donde: *Ht* y *Hi* poseen la misma definición de las ecuaciones mostradas anteriormente (Freeland, 2005). La relación entre los tres índices se da con la siguiente fórmula:

$$Fit = Fis + Fst - (Fis)(Fst)$$

## **2.3. Marcadores moleculares**

### **2.3.1. Microsatélites**

Los microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSR) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Están localizados tanto en regiones codificantes como no codificantes y están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma eucariótico (Fig.9). Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (Arif y Khan, 2009; Aranguren-Mendez *et al.*, 2005).

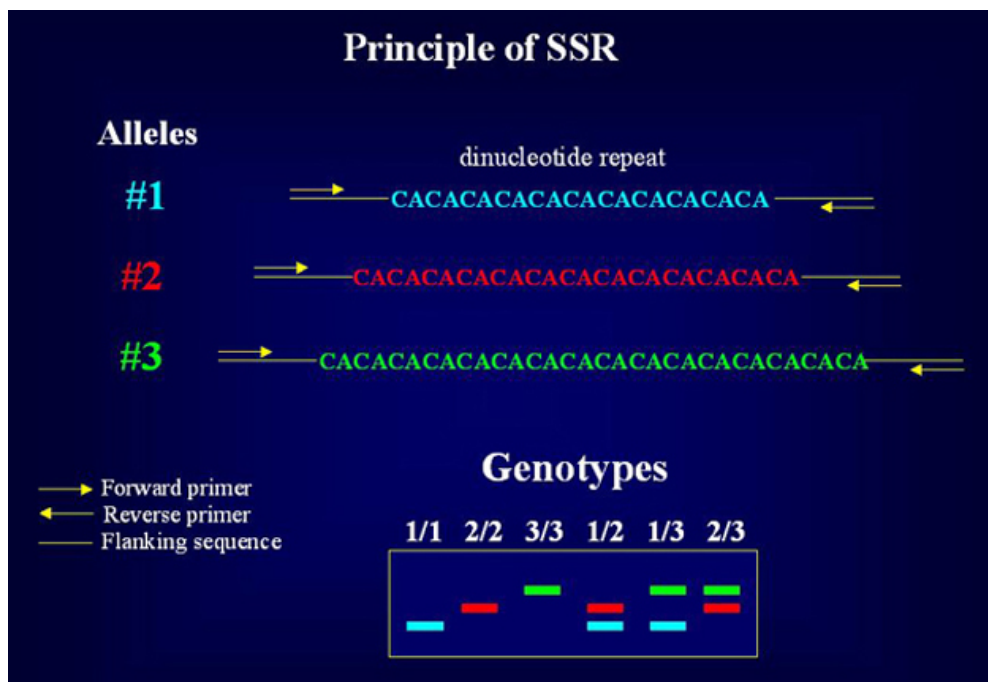




### 2.3.1.1. Características de los microsatélites

Los microsatélites son marcadores co-dominantes pudiendo ser bi-alélicos o multi-alélicos en un individuo o en una población respectivamente (Arif y Khan, 2009).

Una de sus principales características es su alto polimorfismo. El origen de tal polimorfismo está aún en debate, aunque previsiblemente se deba al evento de "resbalón" o *slippage* durante la replicación del DNA, en el cual ya sea la cadena nueva o la cadena patrón se desliza sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas (Fig. 10). Otras posibles causas para la generación de polimorfismo se deben a otros tipos de mutaciones, como las deleciones e inserciones, ya sean en el microsatélite en sí o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región microsatélite. La duplicación de una secuencia microsatélite en otra región del genoma da lugar a la generación de marcadores microsatélites multilocus (Yañez, 2002).



**Fig. 10** Detección de polimorfismo utilizando análisis de microsatélites (Mohamed, 2005)

Algunas de las características de estos marcadores versus otros (minisatelites, RFLPs, RAPDs, etc.), considerados por la mayoría de los autores como una poderosa herramienta para estudios genéticos son: presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100 %, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Cuadro 1) (Aranguren-Mendez *et al.*, 2005).

**Cuadro 1.** Características de diversos marcadores de ADN nuclear (Arif y Khan, 2009)

	<b>RAPD</b>	<b>AFLP</b>	<b>Microsatélites</b>
<b>Información alélica</b>	Dominante	Dominante	Co-dominante
<b>Visualización de locus</b>	Multi-locus	Multi-locus	Single locus
<b>Requerimiento de ADN(<math>\mu</math>g)</b>	0.02	0.5	0.05
<b>PCR previa</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Digestión</b>	No	Sí	no (sí para desarrollarlos)
<b>Costos</b>	Bajo	Moderado	Alto
<b>Costo por ensayo</b>	Bajo	Moderado	Bajo

#### 2.3.1.2. Clasificación de los microsatélites

Chambers y MacAvoy (2002) proponen que se utilicen los términos, 1) *puro* (o *perfecto*), 2) *compuesto* y 3) *complejo* para especificar que uno, de dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término *interrumpido* (o *imperfecto*) como un descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites (Cuadro 2) (Hoyos, 2009).

**Cuadro 2.** Tipos de microsatélites (Yáñez, 2002).

Tipo de microsatélite	Ejemplos
SSR Puro	(ACC) <sub>9</sub>
SSR Interrumpido puro	(ACC) <sub>6</sub> - TG - (ACC) <sub>7</sub>
SSR Compuesto	(ACC) <sub>5</sub> - (TTG) <sub>9</sub>
SSR Interrumpido compuesto	(ACC) <sub>8</sub> - TG - (ACC) <sub>5</sub> - GA - (TTA) <sub>6</sub>
SSR Complejo	(ACC) <sub>8</sub> - TG - (Ga) <sub>12</sub> - (TTA) <sub>5</sub> - GC - (TTA) <sub>4+3</sub>

### 2.3.1.3. Aplicaciones de los microsatélites

#### A. IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL Y PRUEBAS DE PATERNIDAD

El principio de la prueba de paternidad utilizando marcadores genéticos consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores. Como principio mendeliano, uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y otro de la madre. En dicho análisis, al igual que la identificación individual, la identificación del(os) testigo(s), tanto a nivel fenotípico como genotípico debe ser perfectamente conocida y concordante con la información obtenida en los análisis realizados al individuo (Aranguren-Mendez *et al.*, 2005).

#### B. MAPAS GENÉTICOS Y GENÓMICA COMPARATIVA

Otra aplicación de los microsatélites es la construcción de mapas de ligamiento más completos y detallados, así como la identificación de genes de interés (QTLs) (Aranguren-Mendez *et al.*, 2005).

En un proyecto genómico, estos mapas de ligamiento facilitan el marco de referencia para el ensamblaje a lo largo de los cromosomas de las secuencias de ADN obtenidas en los programas de secuenciación genómica. Sin embargo, los mapas genéticos proporcionan por sí mismos importante información acerca de los genomas: son esenciales para entender el comportamiento de los cromosomas y sus interacciones durante la meiosis (Sakamoto *et al.*, 2000); permiten la localización de elementos

genómicos estructurales, marcadores moleculares y loci que influyen en caracteres mendelianos pero también la disección genética de rasgos cuantitativos (QTL) (Lynch y Walsh, 1998); suministran estimas del tamaño genómico; y posibilitan el estudio evolutivo mediante mapeo comparativo. Por ello, en la mayoría de las especies, incluyendo los peces, uno de los principales objetivos de los proyectos genómicos ha sido la obtención de mapas de ligamiento (Gonzales, 2008).

### **C. ESTUDIOS EN GENÉTICA DE POBLACIONES**

Representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permiten estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos y en peligro de extinción. Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, al utilizar un buen número de loci analizados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una buena aproximación de la filogenia. En los estudios de genética de poblaciones los marcadores permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos, así como también realizar análisis filogenéticos y de estructura de la población (Aranguren-Mendez *et al.*, 2005).

## **2.4. Técnicas genéticas no invasivas**

El manejo integral de animales silvestres puede necesitar el monitoreo genético y endocrinológico para determinar tanto la diversidad genética y el potencial reproductor (en poblaciones en vías de extinción) como el nivel de estrés (en poblaciones perturbadas). Para tales propósitos, anteriormente se utilizaba el muestreo de sangre o de tejido, lo que implicaba la captura y manipulación de animales (métodos

invasivos). Este procedimiento puede causar estrés e incluso hacer daño a los animales, no es deseable en el manejo integral del animal, sobre todo si se trata de animales en peligro de extinción. Además, la captura podría causar un aumento de timidez de los animales lo que puede impedir observaciones de comportamiento a corta distancia. Métodos invasivos tampoco son apropiados para obtener muestras diarias (al menos no en el campo), algo necesario generalmente en el monitoreo endocrinológico. Finalmente, hay especies cuyas muestras de sangre no pueden ser utilizadas para análisis genéticos. Por ejemplo, los primates de la familia *Callitrichidae* son quimeras de sangre, es decir que desde muy temprano en la fase embrional los mellizos intercambian células primogénitas de sangre y de linfa mediante conexiones placentarias por tanto en la sangre y en la linfa se encuentran células de ambos hermanos (Curtis *et al.*, 2000; Terio *et al.*, 2002).

El desarrollo de métodos para realizar análisis hormonales y genéticos con base en muestras fecales (métodos no-invasivos) ofrece una nueva perspectiva para el monitoreo de animales silvestres. Estos métodos aprovechan el hecho que los productos de excreción (saliva, orina, heces) contienen ADN y productos de desintegración de hormonas. Dado que las concentraciones de las hormonas fecales reflejan las concentraciones de las hormonas en la sangre, el monitoreo de las hormonas fecales permite la determinación de ovulaciones, duración de ciclos ováricos y gestaciones. El ADN proviene de células intestinales y mediante PCR se puede producir grandes cantidades de partes específicas del ADN incluso de muestras pequeñas que contienen solo ADN impuro y degradado. Con métodos no-invasivos es posible obtener muestras diarias sin causar estrés a los animales y sin causar daño o timidez. Muestras fecales incluso son apropiadas para análisis genéticos de quimeras de sangre. Otra ventaja es que las muestras fecales puestas en alcohol o "buffer" no necesitan refrigeración, así que el método es apropiado también en el campo (Curtis *et al.*, 2000; Terio *et al.*, 2002).

#### **2.4.1. Análisis moleculares usando material no invasivo**

Bayes *et al.* (2000) evaluaron la fiabilidad de los microsatélites con muestras provenientes de ADN fecal en babuinos de la sabana. Empezaron con un set de 21 microsatélites humanos que amplificaban para muestras de sangre de babuino y los probaron con muestras de heces. Fueron 8 los microsatélites que amplificaron ADN proveniente de muestras de heces, luego, cada microsatélite fue marcado con un fluoróforo y secuenciado en un ABI 377. Se usaron muestras de sangre para tener los controles de los alelos de cada microsatélite y luego se probó las muestras con ADN de heces. Con esto mostraron la eficiencia de las fuentes tanto de sangre como de heces concluyendo que el rango de éxito de las amplificaciones derivado del material de heces fue suficientemente alto como para justificar su uso en otras poblaciones silvestres.

Parsons, en 2001, probó la eficiencia de la genotipificación con microsatélites a partir de muestras de heces de delfín nariz de botella. Este fue un estudio piloto que demostró el uso de heces de delfín en estudios de genotipificación con microsatélites multilocus.

Estudios en heces de rumiantes como la cabra de montaña (Poole *et al.*, 2011), el cérvido Sitka de cola negra (Brinkman *et al.*, 2011) y la oveja de las montañas Rocosas (Wehausen *et al.*, 2004, Luikart *et al.*, 2006), han demostrado la eficacia de aplicar técnicas moleculares en estas especies que, como la vicuña, depositan sus heces en forma esférica (*pellets*).

#### **2.4.2. Análisis genéticos de poblaciones de vicuñas**

Wheeler *et al.* (2001) publicaron el artículo “Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú”. En él analizaron 12 poblaciones utilizando 11 microsatélites específicos para camélidos sudamericanos, los resultados de estos análisis mostraron que las poblaciones de vicuñas en el Perú poseen interesantes y

fuertes características genéticas, resultado de su biología, hábitat que ocupan, historia evolutiva y la influencia del manejo humano en el pasado reciente. En primer lugar concluyeron que las vicuñas del Perú tienen niveles de diversidad genética relativamente bajos dentro de las poblaciones pero altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones sentando un precedente de la importancia de los futuros planes de manejo para la producción de fibra en vicuña, debiéndose tomar en cuenta la diversidad genética de las poblaciones.

Además, Wheeler *et al.* identificaron 4 diferentes grupos demográficos: Junín Norte, Junín Sur, Andes Centrales y Puno. Propusieron que estos 4 grupos genéticos podrían formar unidades de manejo separados para el futuro aumento demográfico dentro y entre las poblaciones de cada unidad.

Norambuena y Paredes (2003) realizaron un trabajo en dos regiones del norte de Chile con poblaciones de *Vicugna vicugna*, basándose en diferencias fenotípicas existentes en las vicuñas de esas poblaciones, vieron necesario re-estudiar su posición taxonómica y obtener antecedentes de variabilidad genética y estructura poblacional que podrían resultar útiles en su manejo y conservación. Analizaron 11 enzimas, dos proteínas generales y la hemoglobina por medio de electroforesis en gel horizontal de almidón. En la población de vicuñas de la primera región detectaron un polimorfismo de 17.8% y un nivel de heterocigosidad 0.078. En la segunda región, un nivel de polimorfismo de 14.3% y 0.045 de heterocigosidad. Estos parámetros revelaron un alto grado de variabilidad genética poblacional. Encontraron un nivel de sub estructuración démica alto ( $F_{st}=0.344$ ) y un grado de diferenciación génico y genotípico significativo entre las poblaciones. Infirieron con esto que la deriva génica y el sistema social poligámico tendrían un rol importante como promotores de las diferencias genéticas observadas. El valor de distancia génica ( $D=0.097$ ) no confirmó el estatus sub específico atribuido con base en sus diferencias morfológicas.

Marín *et al.* (2007) secuenciaron la región control (CR) del ADN mitocondrial para 261 individuos provenientes de 19 poblaciones del Perú, Chile y Argentina con la finalidad



de examinar la evolución y la historia demográfica reciente de la vicuña a través de su rango actual y para conocer su variación genética y estructura poblacional. Los resultados obtenidos por Marín *et al.* sugieren que las poblaciones actuales designadas como *Vicugna vicugna vicugna* y *Vicugna vicugna mensalis* comprenden linajes mitocondriales separados.

Aun no existen trabajos centrados en el impacto de los modelos de semi cautiverio en poblaciones de vicuñas peruanas y la manera en que está afectando este sistema en el genoma de la especie.

#### **2.4.3. Trabajos realizados usando microsatélites en otras especies**

En 2010 Bomcke *et al.* estimaron la diversidad genética de la raza de pony Skyros utilizando 12 microsatélites, a través de los análisis de microsatélite y pedigree lograron determinar que la raza Skyros presenta una diversidad genética similar a las de otras razas de Europa. Aunque análisis más profundos usando esta misma información revelaron que la pérdida de la diversidad genética de esta raza ocurrió mucho antes que se empezara el registro de la misma. Los análisis indicaron la posible existencia de un reciente cuello de botella en dos de las tres principales razas de Skyros. Sin embargo, estos análisis también mostraron unos niveles de heterocigosidad y polimorfismo relativamente altos, lo cual indicaba una variabilidad genética residual suficiente como para planear una estrategia de conservación para la raza.

En 2010, Spencer y Woolnough lograron caracterizar seis poblaciones de camellos (*Camelus dromedarius*) de Australia utilizando 28 microsatélites de los cuales sólo 18 microsatélites resultaron polimórficos, ellos justificaron la realización de este trabajo en las características que hacen de los camellos una raza tan importante para la población de Australia. Para esto, analizaron la estructura genética y evaluaron la diversidad genética. Utilizando índice F obtuvieron bajos niveles de estructura

poblacional y diversidad genética lo cual sugiere que estas poblaciones comenzaron desde un pequeño grupo fundador.

En 2005 Nolte *et al.* reportaron nuevos datos demográficos y genéticos en poblaciones de camellos africanos (*Camelus dromedarius*). Analizaron genéticamente 234 camellos usando 12 loci microsatélites. Los análisis utilizando estadísticos F mostraron que las poblaciones de camellos del sur de África están muy relacionadas, lo cual fue confirmado con datos históricos. Los análisis genéticos también dieron una base científica para manejos genéticos futuros. Además, el cálculo de la diversidad genética puede ser usado para decidir cual población debería tener prioridad al momento de introducir animales para mantener buenos niveles de diversidad genética y, por supuesto, los coeficientes de diferenciación pueden ser usados para determinar las poblaciones adecuadas para realizar traslados, lo cual evitará la mezcla de animales relacionados.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

El manejo de la vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*) en sistemas de cautiverio afecta su variabilidad genética.

#### 3.2. Objetivos

##### 3.2.1. Generales

Determinar el estado actual de la variabilidad genética en 3 poblaciones de vicuñas que se encuentran en cautiverio.

##### 3.2.2. Específicos

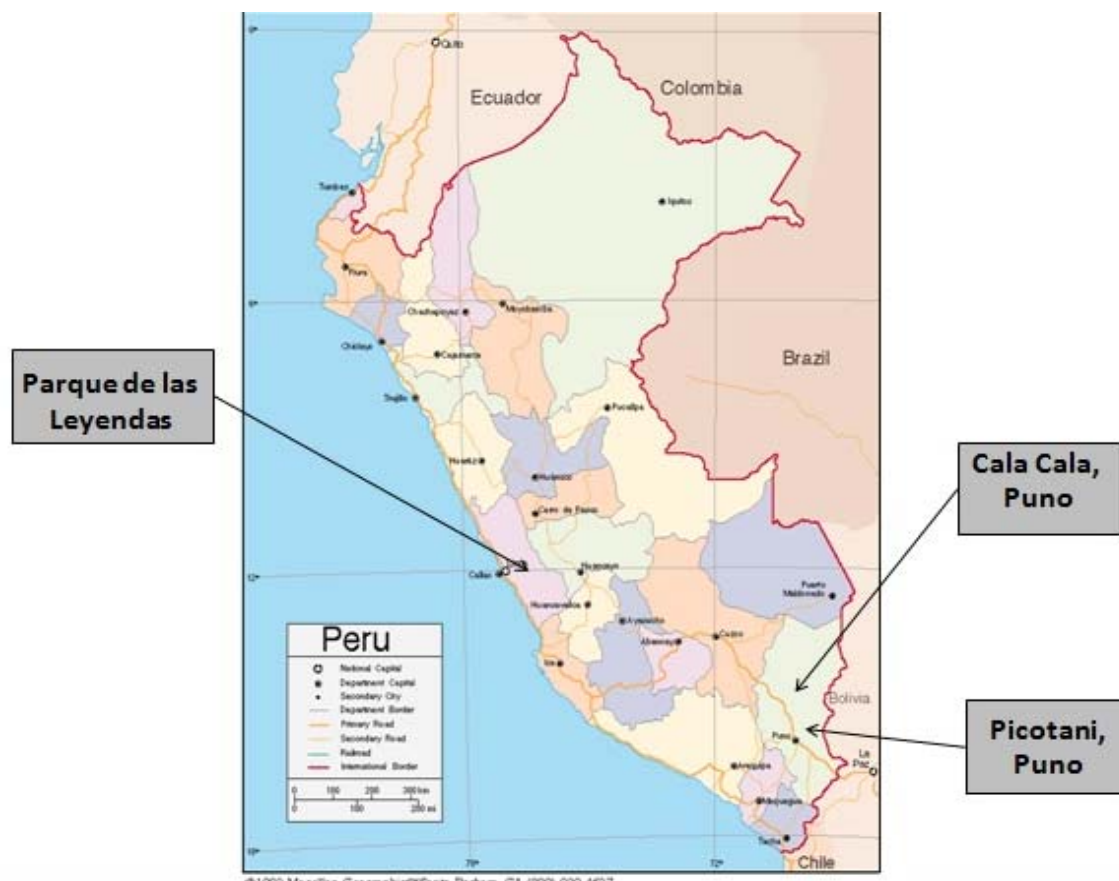
1. Establecer una metodología para la extracción de ADN a partir de muestras no invasivas (heces).
2. Determinar el grado de eficiencia en el análisis de muestras de heces para los 11 microsatélites utilizados.
3. Evaluar la diversidad genética de tres poblaciones de vicuñas que se encuentran en cautiverio a través del análisis de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), utilizando muestras no invasivas.
4. Determinar el grado de relación genética de estas poblaciones mediante el índice  $F_{st}$  y el análisis de correspondencia factorial.
5. Comparar la diversidad genética de poblaciones en cautiverio vs. la diversidad genética de las poblaciones silvestres de estudios previamente realizados.

## IV.MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIALES

#### 4.1.1. Poblaciones de estudio

El trabajo fue desarrollado con muestras de las poblaciones de Picotani (n=28), Cala Cala (n=28), ambas ubicadas en el departamento de Puno, en la provincia de Putina y una última población tomada de las vicuñas del Parque de Las Leyendas (n=16) ubicado en la provincia de Lima, en el distrito de San Miguel (Fig. 11). Un total de 72 muestras fueron obtenidas a partir de heces frescas colectadas en campo (Ver Cuadro 3).



**Fig 11.** Lugares de colecta de muestra

**Cuadro 3.** Poblaciones de estudio

Departamento	Provincia	Distrito	Organización	Muestras de heces
Puno	Putina	Putina	Picotani	28
Puno	Putina	Pedro Vila Apaza	Cala Cala	28
Lima	Lima	San Miguel	-----	16

#### **4.1.2. Transporte de muestras y lugar de estudio**

Las muestras fueron almacenadas directamente en campo preservándolas en tubos Falcon de 50 ml con etanol absoluto. De esta forma fueron transportadas al laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM donde fueron procesadas y analizadas.

### **4.2. METODOLOGÍA**

#### **4.2.1. Colecta de muestras no invasivas**

Para realizar la toma de muestras, primero se localizó a las vicuñas logrando en casi todos los casos identificar a los individuos del grupo familiar (macho, hembra y crías) y se les observó a una distancia que fuese lo suficientemente amplia como para no alterar a los animales y que estos se comportaran normalmente. Luego se esperó a que utilicen los estercoleros. A continuación, se ubicó el estercolero y se procedió a recolectar las muestras frescas (Figura 12). Las muestras fueron almacenadas en tubos nuevos estériles Falcon de 50 ml conteniendo etanol absoluto (Figura 13). También se recolectaron los *pellets* hallados en los estercoleros que tuvieran apariencia fresca (no mayor a 8 horas expuestas al sol) y que se pueda distinguir que pertenecen a individuos diferentes.



**Fig. 12.** Colecta de heces frescas en la Comunidad de Picotani-Puno, Perú



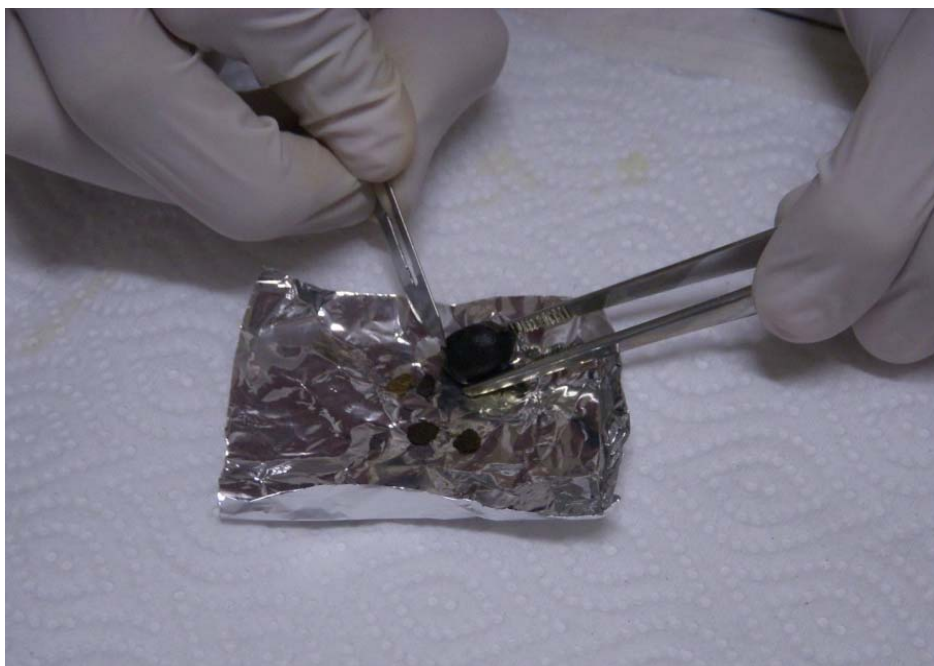
**Fig.13.** Muestras de heces de *V.v mensalis* almacenadas en campo

Los tubos fueron cerrados herméticamente y transportados a Lima a temperatura ambiente. Una vez en el laboratorio, se almacenaron a -20°C entre 14 y 20 días hasta su procesamiento.

#### **4.2.2. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de heces almacenadas en etanol absoluto (Bhagavatula y Singh, 2006; Bayes *at al*, 2000). Como paso inicial se tomaron entre 180 y 200 mg de corteza de los *pellets* de heces procurando descartar todo el material interno de los mismos realizando pequeños raspados con una hoja de bisturí (Figura 14). El propósito de esto fue extraer el ADN de las células del colon del animal desprendidas durante la salida de las heces e impregnadas en su superficie, evitando la menor cantidad de contaminantes e inhibidores de la PCR (Green *at al.*, 2007).

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit de QIAGEN con una modificación en el protocolo. Dicha modificación consistió en colocar los 200 mg de material fecal extraído con 3-4 ml de buffer de lisado (ASL) y con ayuda de un vortex se agitó de manera constante por 15 minutos durante cuatro días consecutivos. Luego se continuó con el proceso de extracción descrito por el fabricante.



**Fig.14** Toma de la corteza de los *pellets* de heces de *V.v. mensalis*

La verificación de la calidad y cantidad de ADN fue realizada en geles de Agarosa al 0.8%, la concentración fue estimada por la intensidad de la luminiscencia utilizando el marcador *fago lambda* cortado con la enzima *Hind* III.

#### **4.2.3 Análisis mediante la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)**

Se analizaron 11 loci microsatélites para camélidos sudamericanos (CSA) descritos por Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998), los cuales fueron marcados con los fluoróforos FAM y HEX (Cuadro 4).



**Cuadro 4.** Microsatélites utilizados en el proyecto

Loci	Referencia	Primer (5' - 3' ) Forward marcados	Reverse	Tamaños de alelos	Na
YWLL 08	Lang <i>et al.</i>	FAM - ATCAAGTTTGAGGTGCTTTCC	CCATGGCATTGTGTTGAAGAC	127 - 195	31
YWLL 29	Lang <i>et al.</i>	FAM - GAAGGCAGGAGAAAAGGTAG	CAGAGGCTTAATAACTTGCAG	216 - 226	5
YWLL 36	Lang <i>et al.</i>	HEX - AGTCTTGGTGTGGTGGTAGAA	TGCCAGGATACTGACAGTGAT	106 - 180	16
YWLL 38	Lang <i>et al.</i>	FAM - GGCCTAAATCCTACTAGAC	CCTCCTCACTCTTGTTCCTC	172 - 176	3
YWLL 40	Lang <i>et al.</i>	FAM - CACATGACCATGTCCCCTTAT	CCAGTGACAGTGTGACTAAGA	180 - 192	7
YWLL 43	Lang <i>et al.</i>	HEX - ATACCTCTCTTGTCTCTCTC	CCTCTACAACCATGTTAGCCA	137 - 157	10
YWLL 44	Lang <i>et al.</i>	HEX - CTCAACAATGCTAGACCTTGG	GAGAACACAGGCTGGTGAATA	105 - 141	18
YWLL 46	Lang <i>et al.</i>	HEX - AAGCAGAGTGATTTAACCGTG	GGATGACTAAGACTGCTCTGA	96 - 100	3
LCA 5	Penedo <i>et al.</i>	HEX - GTGGTTTTTGCCCAAGCTC	ACCTCCAGTCTGGGGATTTC	187 - 213	12
LCA 19	Penedo <i>et al.</i>	FAM - TAAGTCCAGCCCCACACTCA	GGTGAAGGGGCTTGATCTTC	97 - 125	14
LCA 22	Penedo <i>et al.</i>	HEX -TAAGAGTCTAAAAGAGAAAGGC	CAGATGACAGCTGGGATTGA	113 - 125	7

Na. Número de alelos por locus (FAM, HEX: Fluoróforos)

Para el ensayo de la PCR se utilizó el Kit Multiplex de la empresa Qiagen (Gardipee, 2007; Berbegal *et al.*, 2011). Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la FMV y consistió en un volumen final de 30 µl con aproximadamente 30 ng de ADN, 15 µl de buffer de PCR 2X (Taq, dNTPs), 0.75 µl de cada primer marcado a una concentración de trabajo de 10 µM (Cuadro 5).

Para el ensayo de PCR los microsatélites fueron separados en cuatro grupos y por consiguiente en cuatro diferentes reacciones de PCR según la temperatura de *annealing* (Ta) de cada primer, el tamaño de sus alelos y el fluoróforo utilizado (Cuadro 6).

**Cuadro 5.** Condiciones de la PCR para el análisis de los cuatro grupos de microsatélites para CSA

Mezcla para la PCR			Ciclos de la PCR
Reactivos	Concentración final	Volumen	
Mix 2X	1X	15 µL	95 °C x 15 min
Primer ( F )	10 µM/µL	0.75 µL	95 °C x 30 segundos
Primer ( R )	10 µM/µL	0.75 µL	60 °C x 30 seg. ( <b>Grupo 1</b> )
Primer ( F )	10 µM/µL	0.75 µL	59 °C x 30 seg. ( <b>Grupo 2</b> )
Primer ( R )	10 µM/µL	0.75 µL	58 °C x 30 seg. ( <b>Grupo 3 y 4</b> )
Primer ( F )	10 µM/µL	0.75 µL	.....x 35 ciclos
Primer ( R )	10 µM/µL	0.75 µL	72 °C x 10 minutos
H <sub>2</sub> O		7.5 µL	
ADN		3 µL	
Vol. Final x Muestra		30 µL	

**Cuadro 6.** Los cuatro grupos de microsatélites separados por fluoroforo, tamaño de alelos y temperatura de *annealing* (Ta)

Locus	Grupos	Alelos	Ta
YWLL-38	1	[ 172 ----176 ]	60°C
YWLL-36		[ 137 ----157 ]	
LCA-19		[ 97----125 ]	
YWLL-40	2	[ 180 ----192 ]	59°C
YWLL-46		[ 96 ---- 100 ]	
YWLL43		[ 137 ----157 ]	
LCA-22	3	[113-----125]	58°C
YWLL-08		[127-----195]	
YWLL-29		[216-----226]	
LCA-5	4	[187-----213]	58°C
YWLL-44		[105-----141]	

#### **4.2.4 Electroforesis**

Para verificar la correcta amplificación de los microsatélites, los resultados de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando un marcador de 100 pb para corroborar los tamaños de los alelos, esto se realizó previo análisis en el secuenciador ABI 3100 para la determinación de los tamaños de los microsatélites.

#### **4.2.5. Secuenciamiento y determinación de microsatélites (alelos)**

Un primer paso para el análisis de los microsatélites fue el obtener un banco de patrones para cada alelo, esto se realizó con muestras de sangre de alpacas las cuales tenían alelos conocidos. Una vez obtenidos los patrones para cada microsatélite, se pudo empezar a trabajar las muestras. Para el secuenciamiento, las muestras fueron enviadas a los laboratorios de MacroGen - Korea para ser analizadas en un secuenciador ABI 3700. Los análisis para la determinación de los tamaños de los alelos fueron realizados con el programa Genoprofiler 2.0 (You *et al.*, 2007). Gracias a los alelos patrones se pudo determinar con precisión los tamaños de los alelos.

#### **4.2.6. Análisis estadístico y determinación de variabilidad genética**

Para determinar la diversidad genética se calculó la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) de las tres poblaciones en estudio. Para determinar la relación genética entre poblaciones se evaluó el índice  $F_{st}$  y para estimar el grado de consanguinidad que existe en cada población se utilizó el índice  $F_{it}$ . Los cálculos y procedimientos se efectuaron empleando los programas GENETIX v4.0 (Belkhir *et al.*, 1996) y GENEPOP v4.0 (Raymond y Rousset, 1995).

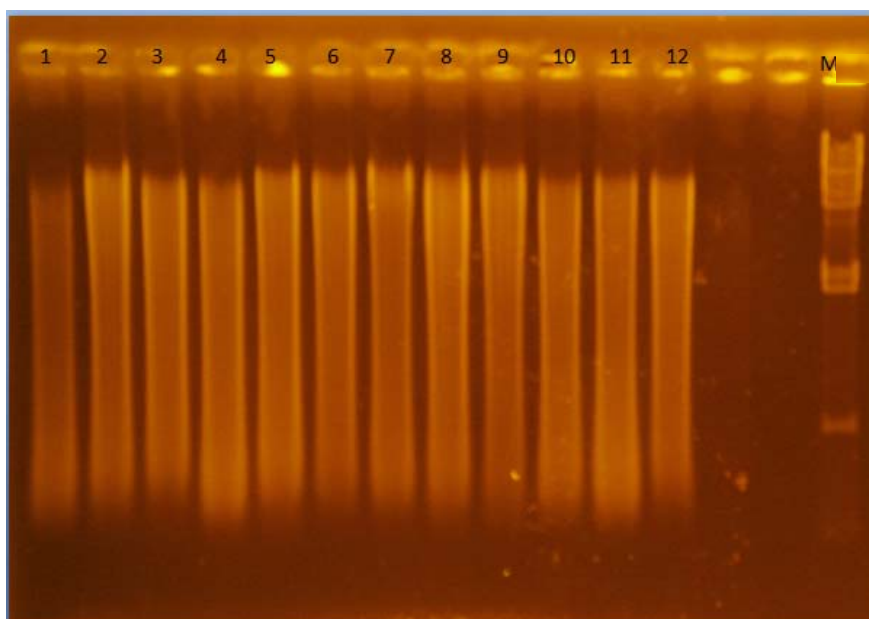
El cálculo de las frecuencias alélicas para cada población y el análisis de correspondencia factorial se realizó con el programa GENETIX v4.0 (Belkhir *et al.*, 1996) y las frecuencias alélicas de las tres poblaciones juntas se realizó en el programa Molkin v2.0 (Gutierrez *et al.*, 2005).

## V. RESULTADOS

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de las células intestinales que fueron arrastradas con las heces al momento de la defecación, estas fueron previamente almacenadas en etanol absoluto con la finalidad de preservar la integridad del ADN. Para la extracción se utilizó el kit comercial de Quiagen (Stool Mini kit) al cual se le realizó una modificación en la fase de lisis celular, esta modificación fue llevada a cabo en el laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

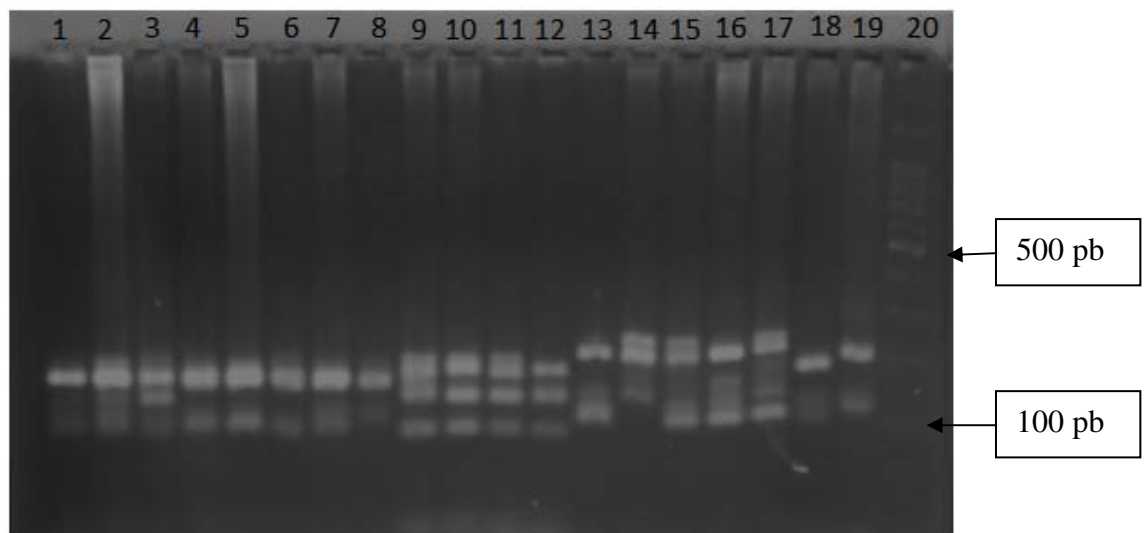
Se logró obtener una gran concentración de ADN en todas las muestras colectadas. Sin embargo, como se ve en la figura 15, los resultados de la extracción muestran un barrido, esto debido a que el ADN se ha fragmentado en diversos tamaños, desde muy grandes a pequeños pedazos.



**Fig. 15.** Gel de agarosa al 0.8% mostrando la calidad y cantidad de ADN extraído a partir de muestras de heces. Pocillos 1 – 12 corresponden a animales de Cala Cala, Puno. El pocillo M corresponde al marcador Fago Lambda/HindIII

### Análisis de Microsatélites

El análisis para los 11 microsatélites se realizó a partir del ADN extraído de muestras de heces de *V.v mensalis*. La PCR fue optimizada con el Kit Multiplex de Quiagen obteniéndose buenos resultados en geles de agarosa al 2% (Fig.16). Se observó productos de PCR en todas las muestras analizadas. Al tener tamaños de alelos en algunos casos con diferencias de solo dos nucleótidos, el análisis por geles de agarosa no es el más recomendado, pero para propósitos de comprobar si los productos que se obtenían correspondían a los alelos de los microsatélites analizados, esta prueba fue más que satisfactoria. Sin embargo, fue necesaria una re-extracción de ADN y una nueva PCR con el objetivo de evitar *allelic drop-out*, el cual se refiere a la falla en la amplificación de un alelo y así como también la presencia de falsos alelos (Soulsbury *et al.*, 2007; Johnson y Haydon, 2007) de algunas de las muestras (Fig. 16).



**Fig 16.** Visualización de productos de PCR (microsatélites) de muestras de vicuñas de Picotani, Puno. Los pocillos 1- 8 pertenecen al Grupo I, 9 - 12 al grupo II, 13 - 17 al grupo III, 18-19 al grupo IV y 20 al marcador de tamaño molecular (1 Kb).

Los resultados positivos fueron analizados en un secuenciador ABI 3700 y los tamaños de los alelos fueron determinados con el programa Genoprofiler (You *et al.*, 2007) en el cual las ordenadas nos indican la intensidad de la fluorescencia y las abscisas el tamaño aproximado de cada alelo, obteniéndose, en la mayoría de casos, picos bien definidos (intensidad de la fluorescencia alta) para cada microsatélite, permitiendo determinar el número de alelos y sus respectivos tamaños en la figuras(Fig 17, 18 y 19)

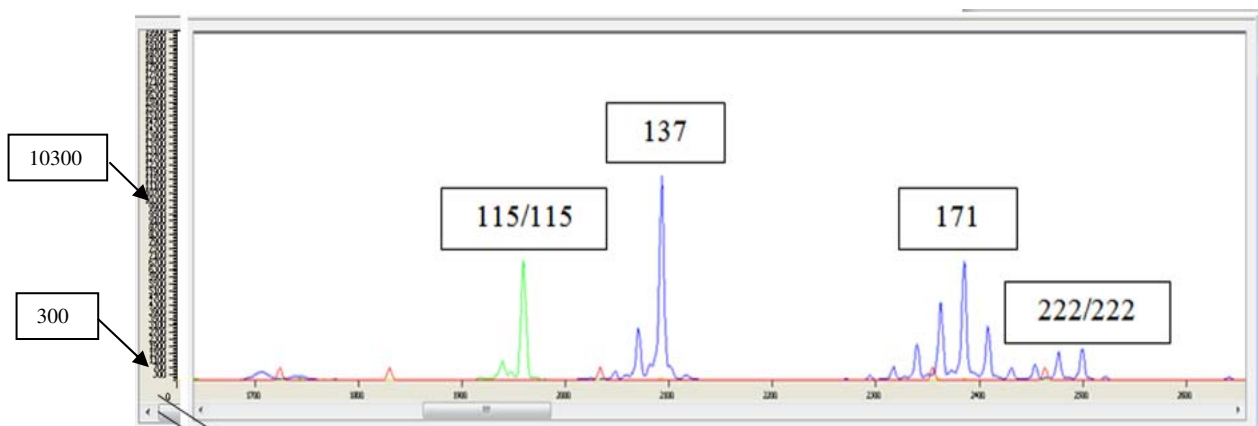


Figura 17. Muestras de vicuñas de Picotani (Puno) analizadas en GENOPROFILER. .  
Los picos corresponden al microsatélite LCA 22 en verde y los microsatélites YWLL08 y YWLL29 en azul.

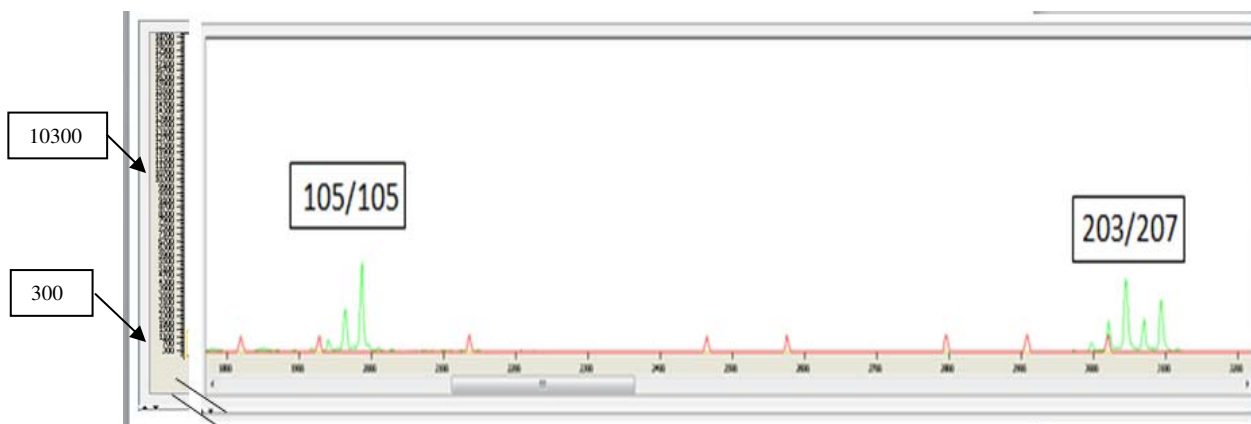


Figura 18. Muestras de vicuñas de Cala Cala (Puno) analizadas en GENOPROFILER.  
Los picos corresponden al microsatélite YWLL44 y LCA5 en verde.

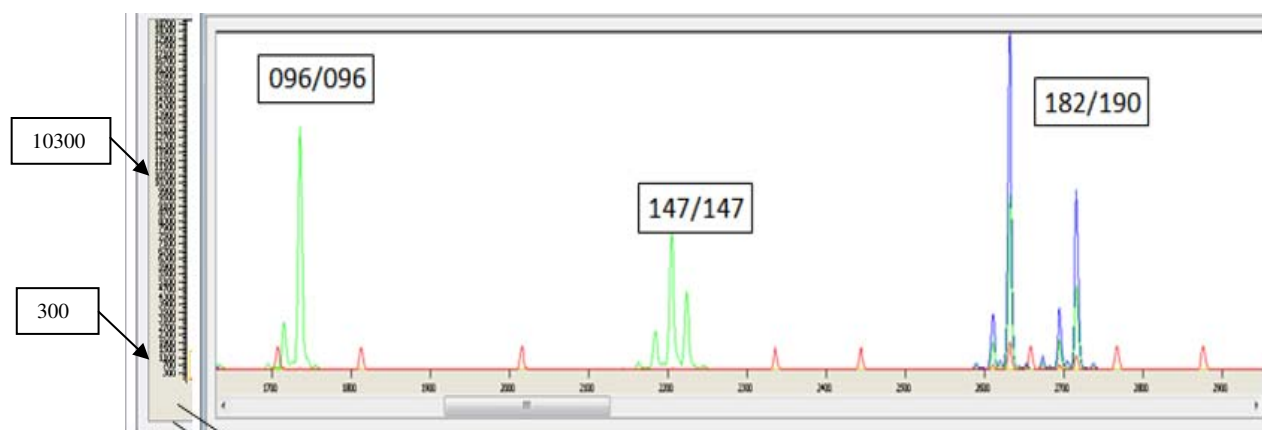


Figura 19. Muestras de vicuñas del Parque de Las Leyendas (Lima) analizadas en GENOPROFILER. Los picos corresponden a los microsatélites YWLL46, YWLL43 en verde y YWLL40 en azul.

Los 11 microsatélites evaluados tuvieron una eficiencia de 84% para todas las muestras de las tres poblaciones. Los valores de eficiencia por población fueron de 89% para la población de Picotani, 79% para la población de Cala Cala y 83% para el Parque de Las Leyendas. En la evaluación por microsatélite, se obtuvo una mayor dificultad en el locus YWLL 38 para las muestras del Parque de las Leyendas (31.25 %) y LCA 5 para las muestras de Cala Cala (50%), como se muestra en el Cuadro 7. Todo lo contrario se observó en otros locus, como el locus LCA 19 de la población de Picotani donde la eficiencia llegó al 100%. En general, los resultados obtenidos a partir del análisis de heces muestran alta similitud en la eficiencia de la extracción, con una desviación estándar muy baja ( $\pm 0.002$ ).

**Cuadro 7.** Porcentaje de eficiencia para los 11 microsatélites utilizados

	POBLACIONES		
	Picotani (n=28)	Cala Cala (n=28)	Parque de Las Leyendas (n=16)
YWLL-36	88.50%	82.10%	87.50%
YWLL-38	92.30%	78.50%	31.25%
LCA-19	100%	89.30%	87.50%
YWLL-40	88.90%	89.30%	93.75%
YWLL-43	84.50%	89.30%	93.75%
YWLL-46	96.20%	89.30%	93.75%
YWLL-08	88.50%	78.60%	93.75%
YWLL-29	88.50%	64.30%	87.50%
LCA-22	96.20%	85.70%	81.25%
YWLL-44	73.10%	67.80%	75.00%
LCA-5	76.90%	50.00%	87.50%
Media	89 ± 0.02	79 ± 0.02	83 ± 0.02

#### Heterocigosidad y Contenido de Información Polimórfico

Los 11 marcadores microsatélites usados en este trabajo mostraron resultados satisfactorios en otros estudios de diversidad genética aplicados en vicuñas, como el realizado por Wheeler *et al* (2001) en donde se analizaron 12 poblaciones del Perú, lográndose identificar adicionalmente cuatro unidades de manejo con diferencias demográficas y genéticas. El número de alelos encontrados en las tres poblaciones analizadas con microsatélites fue significativamente más bajo comparado con los reportados por Wheeler *et al*. debido a que ellos analizaron un mayor número de poblaciones, reportando, por ejemplo, 16 alelos para el locus YWLL 36, diez más que los reportados por Lang *et al*. (1996) y 31 alelos para el locus YWLL 08 para el cual Lang *et al*. reportaron solo 13 alelos en muestras de llamas, excepto para el locus YWLL 29. Aun así, todos los microsatélites utilizados en estas tres poblaciones fueron muy polimórficos, con índices de contenido polimórfico (PIC) entre 91.79% para el locus YWLL 08 y 16.94% para el locus YWLL 38 (Cuadro 8).

Para el locus YWLL 29 se encontraron los alelos 230 y 228, siendo el alelo 228 de muy baja frecuencia en los genotipos de vicuña y no teniéndose reporte del alelo 230



aun en vicuña. Estos 2 únicos alelos se encontraron solamente en la población del Parque de Las Leyendas Leyendas.

Se generaron genotipos y se analizaron estadísticamente todos los 11 microsatélites (número de alelos por locus, heterocigosidad esperada y observada, índice de fijación y coeficiente de consanguinidad). Los microsatélites más informativos fueron el YWLL 08, YWLL 36 los cuales tuvieron un PIC mayor al 80%, por ende tuvieron los valores más elevados de heterosigosidad (0.92 y 0.85 respectivamente) (Ver Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Estimación de la variabilidad genética de 11 microsatélites para 72 muestras de heces de *V.v. mensalis* provenientes de tres poblaciones en cautiverio

Primer	Na	Ne	Ho	He	F	Fis	PIC
YWLL 08	31	23	0.8214	0.9208	0.108	0.0835	91.69%
YWLL 29	5	8	0.5577	0.6263	0.109	-0.0295	57.63%
YWLL 36	16	13	0.83	0.85	0.029	-0.0283	82.89%
YWLL 38	3	5	0.15	0.16	0.076	0.1862	16.94%
YWLL 40	7	6	0.58	0.54	0.079	-0.1110	49.99%
YWLL 43	10	7	0.47	0.66	0.294	0.2110	59.56%
YWLL 44	18	9	0.4468	0.5152	0.133	0.0834	49.60%
YWLL 46	3	4	0.2000	0.18	0.101	-0.1475	20.82%
LCA 05	12	10	0.7333	0.7904	0.072	0.0425	76.75%
LCA 19	14	6	0.63	0.68	0.065	0.0294	62.76%
LCA 22	7	4	0.2131	0.3785	0.437	0.1625	31.85%
Desv. Estándar	8.727 ± 0.103	8.727 ± 0.103	0.512 ± 0.005	0.573 ± 0.005	0.168 ± 0.005	0.044 ± 0.005	

Na: Número de alelos por locus, Ne: Número de alelos observados, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, F: Índice de fijación, Fis: Coeficiente de consanguinidad y PIC: Índice de contenido polimórfico.

El análisis detallado de la heterocigosidad y el número de alelos por locus en cada una de las poblaciones analizadas es mostrado en el cuadro 9, los locus YWLL 36, YWLL 08 mostraron una relativamente constante elevada heterocigosidad (> 0.74). Por otro lado, en lo que respecta a la población de Cala Cala para el locus LCA 22, la heterocigosidad fue de cero ya que sólo el alelo 115 fue identificado en todos los individuos. El número de alelos por locus para la población de Picotani fue de 5.55,

para Cala Cala fue relativamente más bajo (4.36) y el Parque de Las Leyendas no fue tan alto como Picotani (5.27) (Cuadro 10).

**Cuadro 9.** Estimación de la variabilidad genética y el número de alelos por locus para las tres poblaciones analizadas

Locus	Tamaño de alelo (bp)	No de Alelos			Heterosigosidad		
		Picotani	Cala Cala	Pque. de las Leyendas	Picotani	Cala Cala	Pque. de Las Leyendas
					He/Ho	He/Ho	He/Ho
YWLL 36	106 - 180	6	7	9	0,769/0,857	0,745/0,789	0,844/0,833
YWLL 38	172 - 176	3	4	2	0,092/0,095	0,209/0,182	0,18/0,20
LCA 19	97 - 125	7	3	4	0,702/0,68	0,596/0,667	0,63/0,50
YWLL 40	180 - 192	5	4	3	0,644/0,75	0,541/0,60	0,291/0,333
YWLL 43	137 - 157	4	4	5	0,643/0,50	0,564/0,391	0,562/0,533
YWLL 46	96 - 100	2	2	3	0,295/0,36	0,039/0,04	0,24/0,267
YWLL 08	127 - 195	13	13	12	0,882/0,90	0,855/0,667	0,876/0,933
YWLL 29	216 - 226	4	3	6	0,524/0,50	0,627/0,688	0,536/0,50
LCA 22	113 - 125	4	1	2	0,382/0,36	0,000	0,426/0,308
YWLL 44	105 - 141	6	2	5	0,678/0,706	0,332/0,316	0,388/0,273
LCA 5	187- 213	7	5	7	0,772/0,684	0,670/0,75	0,76/0,786

Un total de 96 alelos diferentes (número de alelos por locus) se detectaron en los 11 loci, no todos los loci resultaron polimórficos para todas las poblaciones, YWLL38, YWLL46 y LCA22 tuvieron un PIC bajo. En el cuadro 10 podemos apreciar a la Heterocigosidad esperada como un indicador de variabilidad genética, este valor nos mostró a Picotani como la población genéticamente más diversa mientras que el Parque de Las Leyendas es la menos diversa. Por el contrario, la heterocigosidad observada fue menor que la esperada (0.48) sólo en la población de el Parque de Las Leyendas que además presenta un índice *Fis* alto (0.07) indicando que en esta población existe un cierto nivel de consanguinidad (De la Barra *et al.*, 2010). Esto no ocurre con las poblaciones de Picotani y Cala Cala en donde la heterosigosidad observada es ligeramente mayor que la esperada y aunque la primera muestra niveles

relativamente altos de heterocigosidad tiene índices *Fis* considerables (0.02) que indican ciertos niveles de consanguinidad.

La comparación de las 3 poblaciones analizadas para los estadísticos *F* nos muestra valores elevados de *Fst* (0.106) y *Fit* (0.135). Estos valores se ven incrementados al momento de agregar un grupo externo (Pampa Galeras, Ayacucho) el cual fue analizado con los mismos microsatélites por Wheeler *et al.* 2001 (Cuadro 11).

**Cuadro 10.** Diversidad genética de tres poblaciones en cautiverio.

Poblaciones	H. esp	H. obs	Fis	Fst	Fit	Nro. alelos x locus
Picotani	0.578	0.579	0.024			5.45
Cala Cala	0.47	0.48	0.006			4.36
Parque de Las Leyendas	0.50	0.484	0.074			4.91
				0.106	0.135	

**Cuadro 11.** Diversidad genética de tres poblaciones en cautiverio y un grupo externo control.

Poblaciones	H. esp	H. obs	Fis	Fst	Fit	Nro. alelos x locus
Picotani	0.578	0.579	0.024			5.45
Cala Cala	0.47	0.48	0.006			4.36
Parque de Las Leyendas	0.50	0.484	0.074			4.91
Pampa Galeras	0.5849	0.5394				6.18
				0.1257	0.1797	

Se realizó un cuadro de valores *Fst* pareados (Cuadro 12) para todas las poblaciones, incluido el grupo externo con el fin de tener una mejor visión de las relaciones genéticas entre cada una de las poblaciones analizadas, permitiendo apreciar una menor distancia genética entre las poblaciones de Picotani y Cala Cala y una diferencia significativa (*Fst* = 0.126) entre las 3 poblaciones analizadas y el grupo externo (Cuadro 11).

**Cuadro 12.** Valores pareados del índice *Fst* (Nei, 1978)

<b>Población</b>	<b>Picotani</b>	<b>Cala Cala</b>	<b>Parque...</b>
Cala Cala	<b>0.077</b>	.....	.....
Parque de Las Leyendas	<b>0.171</b>	<b>0.228</b>	.....
Pampa Galeras	<b>0.244</b>	<b>0.245</b>	<b>0.255</b>

#### Análisis de correspondencia factorial

Para finalizar se realizó un análisis de AFC 3D para establecer con mayor claridad las relaciones de la diversidad genética entre las poblaciones analizadas. La figura 18 nos muestra el análisis para las 4 poblaciones en tres dimensiones (Picotani en azul, Cala Cala en amarillo, Parque de las Leyendas en blanco y Pampa Galeras en plomo). Los tres ejes (48%, 32% y % respectivamente) nos explican la relación total entre los 11 microsatélites con cada una de las poblaciones. Nuestro análisis nos muestra un agrupamiento de las poblaciones de Picotani y Cala Cala, además los individuos del Parque de las Leyendas se encuentran muy cerca de estas poblaciones, por otro lado estas tres poblaciones presentan una clara separación con el grupo control.

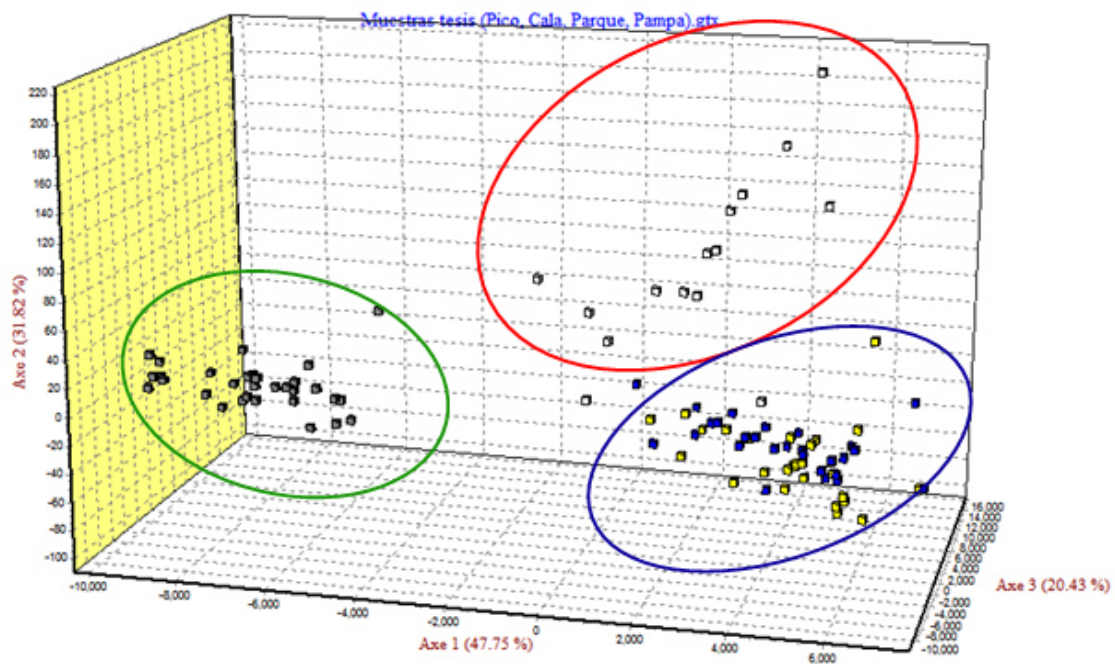


Figura 20. Análisis de correspondencia factorial. El círculo verde corresponde al grupo externo (Pampa Galeras), el círculo rojo al Parque de Las Leyendas y el azul a las poblaciones de Cala Cala y Picotani.

#### Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas de las tres poblaciones juntas (Cuadro 13) se realizaron con el programa Molkin v3.0 el cual nos muestra una tendencia a la fijación de ciertos alelos en cada uno de los locus analizados (Alelos sombreados). Las frecuencias encontradas para un alelo fueron mayores al 0.6 y en algunos casos, como el YWLL 38, la frecuencia alélica fue de 0.9 (Cuadro 13). Se comparó estas frecuencias con las del grupo control (Pampa Galeras) y se observó que en algunos de los loci analizados, ciertos alelos presentaron frecuencias relativamente bajas, como es el caso de YWLL 36 en donde las frecuencias de algunos alelos disminuyeron hasta 0.01% cuando en el grupo control es de 36%.

Cuadro 13. Frecuencias alélicas de las tres poblaciones analizadas, los alelos marcados en negro indican una mayor frecuencia en las poblaciones analizadas.

<i>Locus</i>	<i>Alelo (bp)</i>	<i>Frecuencia</i>
YWLL36	142	0.27
	152	0.05
	154	0.02
	156	0.01
	158	0.01
	164	0.01
	168	0.03
	170	0.17
	172	0.03
	174	0.08
	176	0.18
	178	0.03
	182	0.03
	174	<b>0.91</b>
YWLL38	176	0.02
	177	0.03
	178	0.02
	179	0.02
	179	0.02
LCA19	101	0.13
	103	0.45
	105	0.09
	107	0.3
	109	0.01
	113	0.01
YWLL40	182	0.16
	184	0.07
	186	0.05
	188	0.04
	190	<b>0.66</b>
	192	0.02
YWLL43	141	0.01
	143	0.4
	145	0.15
	147	0.4
	149	0.01
	151	0.02
	153	0.02

<i>Locus</i>	<i>Alelo (bp)</i>	<i>Frecuencia</i>
YWLL29	216	0.21
	218	0.01
	220	0.04
	222	0.55
	224	0.01
	226	0.17
	228	0.01
	230	0.01
	115	<b>0.75</b>
	117	0.22
LCA22	121	0.01
	123	0.01
	105	0.02
	107	0.01
	109	<b>0.68</b>
YWLL44	111	0.02
	117	0.07
	119	0.03
	123	0.06
	127	0.1
LCA5	129	0.1
	101	0.01
	189	0.09
	191	0.14
	193	0.01
	195	0.01
	201	0.01
	203	0.34
	205	0.21
	207	0.09
YWLL29	209	0.07
	216	0.21
	218	0.01
	220	0.04
	222	<b>0.55</b>
	224	0.01
	226	0.17

<i>Locus</i>	<i>Alelo (bp)</i>	<i>Frecuencia</i>
YWLL46	96	0.09
	<b>98</b>	<b>0.88</b>
	100	0.02
YWLL08	127	0.09
	129	0.01
	135	0.16
	137	0.06
	139	0.04
	141	0.03
	143	0.02
	147	0.01
	149	0.07
	151	0.02
	153	0.07
	155	0.11
	157	0.05
	165	0.04
	167	0.01
	169	0.03
	171	0.07
	177	0.05
	179	0.01
	181	0.01
	183	0.02
	189	0.01
	191	0.01

<i>Locus</i>	<i>Alelo (bp)</i>	<i>Frecuencia</i>
	228	0.01
	230	0.01
LCA22	<b>115</b>	<b>0.75</b>
	117	0.22
	121	0.01
	123	0.01
YWLL44	105	0.02
	107	0.01
	<b>109</b>	<b>0.68</b>
	111	0.02
	117	0.07
	119	0.03
	123	0.06
	127	0.1
	129	0.1
LCA5	101	0.01
	189	0.09
	191	0.14
	193	0.01
	195	0.01
	201	0.01
	203	0.34
	205	0.21
	207	0.09
	209	0.07

## VI. DISCUSIÓN

En los estudios de conservación, la importancia y necesidad de estudiar la diversidad genética de las poblaciones es ampliamente conocida. Para ello es fundamental contar con herramientas moleculares que brinden información más profunda del estado en el que se encuentran (Lori *et al.*, 2007). Pero, cuando se trata de poblaciones silvestres como la vicuña, surge una disyuntiva, ¿cómo estudiar mejor a la especie sin perturbar al individuo? (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001). En respuesta a esta interrogante se plantea la necesidad de poner en práctica un método no invasivo de colecta de muestra que permita obtener y posteriormente analizar el ADN de *Vicugna vicugna mensalis*.

El análisis de ADN a partir de muestras no invasivas (Taberlet *et al.*, 1999), como son las heces, usando marcadores microsatélites, nos muestra la viabilidad de utilizar este tipo de material en estudios moleculares. Trabajos comparativos analizando muestras de sangre y heces en “Barbarian Macacos” (*Macaca sylvanus*) muestran un 70% de éxito para todos los loci estudiados y un 18.3% de falsos homocigotos o falsos alelos en la PCR (Lathuillere *et al.*, 2001). Otros estudios moleculares con muestras de heces de delfín nariz de botella mostraron una eficiencia para asignar genotipos mayores al 95% (Parsons, 2001). Incluso el análisis de heces se ha logrado realizar en modelos con ratones llegando a obtener un 95% de eficiencia en los análisis (Kalippke *et al.*, 2009).

Existen también estudios en heces de rumiantes como el realizado por Poole *et al.* (2011) en la cabra de montaña para estimar el número de la población logrando identificar 55 individuos de 170 muestras de heces; este estudio provee uno de los primeros estimados estadísticos de una especie de ungulado usando DNA derivado principalmente de heces. Otros son los realizados en el cérvido Sitka de cola negra (Brinkman *et al.*, 2011) y la oveja de las montañas Rocosas (Wehausen *et al.*, 2004; Luikart *et al.*, 2006). Estos estudios demuestran la eficacia de aplicar técnicas



moleculares en estas especies que, como la vicuña, depositan sus heces en forma de bolitas (*pellets*).

En el presente trabajo se logró determinar una eficiencia por locus del 100%, en algunos casos, y no menor del 78% en dos repeticiones. Este análisis se muestra como una poderosa herramienta en el estudio de especies silvestres. En el caso del presente estudio, la extracción de ADN fue un paso crítico para obtener buenos resultados. La modificación del protocolo en la fase de lisis celular resultó crucial en la obtención de grandes cantidades óptimas de ADN. A pesar de encontrarse degradado, éste pudo amplificar correctamente, posiblemente debido a que los marcadores utilizados no fueron de gran tamaño, tal vez al usar marcadores microsatélites con motivos más grandes los resultados no serían tan satisfactorios.

Los 11 marcadores microsatélites usados en este trabajo mostraron resultados satisfactorios en otros estudios de diversidad genética aplicados en vicuñas, como el realizado por Wheeler *et al.* (2001) en donde se analizaron 12 poblaciones del Perú, lográndose identificar adicionalmente cuatro unidades de manejo con diferencias demográficas y genéticas. El número de alelos encontrados en las tres poblaciones analizadas con microsatélites fue significativamente más bajo comparado con los reportados por Wheeler *et al.* (2001) debido a que ellos analizaron un mayor número de poblaciones, reportando, por ejemplo, 16 alelos para el locus YWLL 36, diez más que los reportados por Lang *et al.* (1996), y 31 alelos para el locus YWLL 08 para el cual estos últimos investigadores habían reportado sólo 13 alelos en muestras de llamas, excepto para el locus YWLL 29. Además, Kadwell *et al.* (2001) utilizando ADN mitocondrial y cuatro de los microsatélites utilizados en este trabajo, lograron dilucidar las relaciones genéticas entre los camélidos sudamericanos, con la finalidad de esclarecer los orígenes de la vicuña y el guanaco.

La diversidad genética de las tres poblaciones de vicuñas se evaluó utilizando 11 microsatélites específicos para camélidos sudamericanos (Wheeler *et al.*, 2001) reportados por Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998). En este caso todos ellos resultaron ser polimórficos en las poblaciones analizadas, como resultado estos microsatélites son muy informativos, lo que indica que son una excelente herramienta para estudios de diversidad genética (Wheeler *et al.*, 2001).

El análisis de la C.C. de Cala Cala que se caracteriza por tener uno de los primeros criaderos de vicuña, desde hace más de 58 años (Frankling, 1973), arrojó datos de heterocigosidad bajos (0.4722). Los valores de diversidad genética en especies silvestres por lo general no están por debajo de 0.5 (Wheeler *et al.*, 2001; Manea *et al.*, 2009; Bomcke *et al.*, 2010). Sin embargo, en poblaciones donde existe fragmentación del hábitat, la diversidad genética en especies silvestres puede disminuir considerablemente (García del Valle *et al.*, 2005). A pesar de estos datos, el índice *F<sub>is</sub>* (0.006) nos indica que no hay una deficiencia significativa de heterocigotos y, por ende, la consanguinidad no sería un factor o una causa de la baja heterocigosidad hallada, por lo tanto, apelando al modelo demográfico en que la población ancestral ha tenido una fuerte caída en su número efectivo que la llevó a un cuello de botella genético, lo que resulta en que la población actual tenga una diversidad genética baja en comparación a otras poblaciones silvestres.

Con respecto a la población de Picotani, ésta muestra una diversidad genética ligeramente por encima de la media (0.579). Al tener una población de aproximadamente 4500 animales y de realizar traslados tomando en cuenta la capacidad de carga de los cercos (ICODEAS, 2005), es de esperar que la diversidad genética sea relativamente alta, pero realizar esto sin un estudio genético de sus animales podría poner en peligro la integridad genética de los mismos. Este peligro puede verse reflejado en el índice *F<sub>is</sub>* el cual indica que existe un cierto nivel de consanguinidad (0.024) en esta población, por lo que posiblemente estos traslados no se han realizado adecuadamente.

En el caso del Parque de Las Leyendas, si bien la heterocigosidad no es tan baja como en Cala Cala, aun así ésta sigue teniendo valores bajos con respecto a poblaciones silvestres (0.484). Al comparar los resultados con otras poblaciones silvestres y en cautiverio observamos una clara disminución en el número de individuos heterocigotos ( $F_{is}=0.074$ ) (Bomcke *et al.*, 2010; Nolte *et al.*, 2005) lo que es una indicación de una tendencia hacia la homocigosis que en el futuro puede generar mayores problemas de consanguinidad. Un factor que apoya esta conclusión es la heterocigosidad esperada, la cual es mayor que la observada en el análisis. Esto puede deberse a que existe un cierto aislamiento de la población muy probablemente debido a un problema de consanguinidad (De la Barra *et al.*, 2010).

Los valores del  $F_{st}$  total sugieren que un 90% de la varianza en las frecuencias alélicas se expresa dentro de cada población y solamente el 10% de la varianza se atribuye a diferencias entre poblaciones (Cuadro 10). En promedio, las tres poblaciones analizadas tienen un 4% de deficiencia de heterocigotos mientras que el total de individuos mostró un 14% de déficit de heterocigotos. Esta medida indirecta de la consanguinidad nos indica un alejamiento de las condiciones esperadas en una población con cruzamientos al azar (Manea *et al.*, 2009).

El análisis pareado de las tres poblaciones (Cuadro 12) indica que Cala Cala y Picotani tienen mayor similitud entre ellas al ser comparadas con el Parque de Las Leyendas o Pampa Galeras mediante el software MolKin v4.0. Estos datos nos muestran que estas dos poblaciones son muy similares genéticamente lo cual indica una homogenización del genoma en estos grupos.

Sin embargo, un análisis más detallado apoyado por el análisis pareado de las poblaciones y el análisis de correspondencia factorial, nos agrupa las poblaciones de cautiverio antiguo como son Picotani y Cala Cala, y muy cerca ubica al Parque de Las Leyendas, alejadas estas tres del grupo control que es Pampa Galeras (Fig 18). Esto se debe a que, al no haber diferencia genética entre grupos de Cala Cala y Picotani, la diversidad genética entre estos es mínima, por ende, en un futuro, podrían

comportarse como una sola población. Al no haber datos de traslados de una comunidad a otra (Cala Cala – Picotani y viceversa) esto podría estar indicándonos una posible pérdida de alelos únicos de estas poblaciones.

El análisis de las frecuencias nos muestra una distribución heterogénea de las frecuencias alélicas en algunos loci analizados. El número de alelos por locus para la población de Picotani fue similar a los obtenidos por Wheeler *et al.*, 2001(5.55), para Cala Cala fue relativamente más bajo (4.36) y el Parque de Las Leyendas no fue tan alto como Picotani (5.27) (Cuadro 10). Esto nos muestra que, en realidad, las poblaciones son caracterizadas por unos pocos alelos del total reportado para cada locus. Estos resultados, sumados al índice *F<sub>is</sub>* elevado, excepto en Cala Cala, nos indican que estas dos poblaciones están sufriendo pérdida de diversidad genética.

Finalmente, se ha encontrado que los sistemas de manejo están afectando la diversidad genética de las poblaciones evaluadas, impactándolas y alterando su salud genética con lo cual estas poblaciones no estarían preparadas, en un futuro, para afrontar cambios bruscos en su medio ambiente ni para resistir a posibles nuevas enfermedades (Reed y Frankham, 2003). Será necesario, en el futuro, tomar en cuenta los análisis de diversidad genética para poder establecer el impacto de los diferentes programas de manejo de poblaciones silvestres en el Perú.

## VII. CONCLUSIÓN

1. La información obtenida en este trabajo sugiere que el sistema de manejo en cautiverio de las vicuñas está reduciendo su diversidad genética.
2. La información acerca de traslado de animales dentro de la población de vicuñas de Picotani nos muestra una posible inclusión de nuevos alelos, además es muy probable que animales silvestres de la zona hayan ingresado a las zonas cercadas, con lo cual se ha alterado su pool genético.
3. Las poblaciones de Cala Cala y el Parque de Las Leyendas muestran una reducida variabilidad genética ( $H_o = 0.45$  y  $H_o = 0.49$  respectivamente) pero solo en Picotani y el Parque de Las Leyendas existe evidencia de consanguinidad.
4. Picotani y Cala Cala muestran una muy baja diferenciación genética. Estos datos sugieren que estas poblaciones muy pronto deberán ser manejadas como un solo grupo genético.
5. El análisis de microsatélites a partir de muestras de heces es una técnica altamente eficiente y reproducible en el estudio de diversidad genética de muestras no invasivas de *V.v mensalis*.
6. Se estableció una metodología altamente eficiente (83%) para la extracción de ADN a partir de muestras no invasivas como las heces.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ARANGUREN-MENDEZ J.A y JORDANA J. ***“Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción”***. Aranguren- Méndez y Jordana. 2001.
- ARANGUREN-MENDEZ J.A; ROMAN BRAVO W; ISEA, VILLASMIL Y; JORDANA J. ***“Los microsatélites (STR’s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión”***. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. 2005, vol.13, n° 1, p. 30-42.
- ARIF I.A; KHAN H.A. ***“Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review”***. Animal Biodiversity and Conservation. 2009, vol.32, n° 1, p. 9-17.
- BAYES MK; SMITH KL; ALBERTS SC; ALTMANN J; BRUFORD MW. ***“Testing the reliability of microsatellite typing from faecal DANN in the savannah baboon”***. Conservation Genetics. 2000, vol.1, p. 173–176.
- BELKHIR K; BORSA P; GOUDET J; CHIKHI L; BONHOMME F. ***“GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations”***. Laboratoire du Génome et Populations. 1996-1998, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- BERBEGAL M; GARZON CD; ORTEGA A; ARMENGOL J; JIMENEZ DIAZ RM; JIMENEZ GASCO M.M. ***“Development and application of new molecular***

**markers for analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations**". Plant Pathology. 2011.

- BHAGAVATULA J; SINGH L. 2006. **"Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris tigris* for populations estimation: A pilot study"**. BMC Genetics. 2006, vol. 7, p. 48.
- BOLKOVIC M.L; RAMADORI D. **"Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable"**. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. 2006, Buenos Aires, p. 121-135.
- BOMCKE E; GENGLER N; COTHRAN G. **"Genetic variability in the Skyros pony and its relationship with other Greek and foreign horse breeds"**. Genetic and Molecular Biology. 2010, Send correspondence to E. Gus Cothran. Animal Genetics Lab. Send correspondence to E. Gus Cothran. Animal Genetics Lab, VIBS, CVM, Texas A&M University, TAMU 4458, College Station, TX 77843-4458, USA. E-mail: [gcothran@cvm.tamu.edu](mailto:gcothran@cvm.tamu.edu).
- BONACIC C; FEBER R.E; MACDONALD D.W. **"Capture of the vicuña (*Vicugna vicugna*) for sustainable use: Animal welfare implications"**. Biological Conservation, 2006, vol. 129, n° 4, p. 543-550.

- BRINKMAN T.J; PERSON D.K; CHAPIN III F; SMITH W; HUNDERMARK K.J. ***“Estimating abundance of Sitka black-tailed deer using DNA from fecal pellets”***. The Journal of Wildlife Management. 2011, vol. 75, n° 1, p. 232-242.
- CHAMBERS G; MACAVOY E. ***“Microsatellites: consensus and controversy”***. Comparative and Physiology. 2002, Part B, p. 455-476.
- Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS). ***“La Vicuña (Vicugna vicugna)”***. 2006. Lima - Perú.
- CURTIS D; ZARAMODY A; DI G; PICKARD A. ***“Non-invasive monitoring of reproductive status in wild mongoose lemurs (Eulemur mongoz)”***. Reprod. Fert. 2000, Dev. 12, p. 21–29.
- DE LA BARRA R; URIBE H; LATORRE E; SAN PRIMITIVO F; ARRANZ J. ***“Genetic structure and diversity of four chilean sheep breeds”***. Chilean Journal of Agricultural Research, 2010, vol. 70, n° 4, p. 646-651.
- EGEY J; MIRAGAYA M. ***“Los Camélidos Sudamericanos”***. pR7. 2006, vol. 2, p. 20-22.
- FRANKLIN W.L. ***“High, wild world of the vicuña”***. National Geographic. 1973, vol. 143, n° 1, p. 76 -91.



- FRANKLIN W.L. ***“The social behavior of the vicuña”***. In: Geist V. & Walther F. (Eds.). The behavior of ungulates and its relation to management. 1974, p. 477-487. IUCN. Morges.
- Food and agriculture organization (FAO). ***“Situación de los camélidos sudamericanos en el Perú”***. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. 2005, TCP/RLA/2914.
- FREELAND J.R. ***Molecular ecology***. John Wiley & Sons, Ltd., London, United Kingdom. 2005, 388 pp. ISBN. 13 978-0-470-09061-9.
- GARCIA DEL VALLE, Y; ESTRADA, A; ESPINOZA, E; LORENZO, C; NARANJO, E. ***“Genética de poblaciones de monos aulladores (Alouatta pigra) en habitat continuo y fragmentado en la selva Lacandona, México: Un estudio preliminar”***. Universidad y Ciencia. 2005, Numero especial II: 55-60.
- GARDIPEE, F. M. ***“Development of fecal DNA sampling methods to asses genetic populations structure of greater Yellowstone Bison”***. Tesis Master en Ciencias. The University of Montana Missoula, MT, Montana. 2007.
- GONZALES FORTES, G. ***“Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y microsatélite en Rodaballo (Scophthalmus maximus L.)”***. Asesores: Carmen Bouza, Paulino Martínez, Laura Sánchez. Tesis Grado de

Doctora en Ciencia Biológicas. Universidad de Santiago de Compostela (USC). 2008.

- GREEN M; HERZING D; BLADWIN, J. ***“Noninvasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (Stenella frontalis)”***. Molecular Ecology. 2007, vol. 7, p. 1287-1292.
- GUTIERREZ J. P; ROYO L. J; ALBAREZ, I; GOYACHE, F. ***“MolKin v2.0: A Computer Program for Genetic Analysis of Populations Using Molecular Coancestry Information”***. Journal of Heredity. 2005, vol. 96, n° 6, p. 718-721.
- HOCES D. ***“Promoción de los Camélidos Sudamericanos en el Perú”***. Consejo Nacional de Camelidos Sudamericanos (CONACS). 1995.
- HOCES D. ***“Conservation and current use of the vicuña (Vicugna vicugna mensalis) in Peru”***. NDF Workshop Case studies. 2008, WG 5-mammals CASE STUDY 8.
- HOFMAN R.K; OTTE K; PONCE C.F; RIOS M.A. ***“El Manejo de la vicuña silvestre”***. GTZ. Eschoborn. 1983. 705pp. Tomo I. ISBN. 9783880851139.
- HOYOS, Marco Alonso. ***“Reproducción en la vicuña macho: evaluación del método de contención química, colección de semen, análisis del eyaculado y biometría testicular”***. Asesores: Dra. Martha Valdivia. Tesis Magister en Zoología con mención en Ecología y conservación, UNMSM. Facultad de ciencia Biológicas Unidad de Posgrado. Lima, 2009.

- Instituto de Cooperación y Desarrollo Alternativo Sostenible (ICODEAS). ***“PLAN DE MANEJO: Multicomunal Picotani, Comunidades de Toma, Cambria y Picotani”***. Puno – Perú, 2005.
- JOHNSON P.C; HAYDON D.T. ***“Maximum-Likelihood Estimation of Allelic Dropout and False Alleles Rates from Microsatellite Genotypes in the Absence of Reference Data”***. Genetics. 2005, vol. 175, p. 827-842.
- KADWELL, M; FERNANDEZ, M; STANLEY, H; BALDI, R; WHEELER, J; ROSADIO R; BRUFORD, M. ***“Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca”***. The Royal Society. 2001, n° 268, p. 2575 – 2584.
- KALIPPKE K; WERWITZKE S, VON HORNUNG M; MISCHKE R; GANSER A; TIEDE A. ***“DNA analysis from stool samples: a fast and reliable method avoiding invasive sampling methods in mouse models of bleeding disorders”***. Lab Animals. 2009, vol. 43, n° 4, p. 390-3.
- LANG KD; WAMG Y; PLANTE Y. 1996. ***“Fifteen polymorphic dinucleotide microsattelites in llamas and alpacas”***. Animal Genetics. 1996, n° 27, p. 293.
- LATHUILLIERE, M; MENARD, N; GAUTIER-HION, A; CROUAU-ROY, B. 2001. ***“Testing the reliability of noninvasive genetic sampling by comparing analyses of blood and fecal samples in Barbary macaques (Macaca sylvanus)”***. Animal Journal of Primatology. 2001, vol. 55, n° 3, p. 151-8.

- LICHTENSTEIN, G. ***Manejo comunitario de vicuñas en el Perú. Estudio de caso del manejo de vida silvestre***. Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano. 2002, 94pp, ISBN 1849692295.
- LUIKART G, ZUNDEL S, RIOUX D, MIQUEL C, KEATING KA, HOGG JT, STEELE B, FORESMAN K, TABERLET P. ***“Low Genotyping Error Rates and Noninvasive Sampling in Bighorn Sheep”***. The Journal of Wildlife Management. 2006, vol. 72, n° 1, p. 299-304.
- LYNCH, M. y WALSH B. ***“Genetics and Analysis of Quantitative Traits”***. The American Journal of Human Genetics. 1998, vol. 68, n° 2, p. 548–549.
- LORI S.E, PATTERSON G; MALDONADO J.E. ***“The Knysna elephants: a population study conducted using faecal DNA”***. The Authors. Journal compilation. 2007, Blackwell Publishing Ltd, Afr. J. Ecol. n° 46, p. 19–23.
- MANEA, M.A; GEORGESCU, SE; KEVORKIAN, S. ***“Genetic diversity analysis of seven pig populations based on 10 microsatellites”***. Romanian Biotechnological Letters. 2009, vol.14, n° 6, p. 4827-4834.
- MARIN J.C; CASEY CS; KADWELL, M; YAYA K; HOCES D; OLAZABAL J; ROSADIO R; RODRIGUEZ J; SPOTORNO A; BRUFORD M; WHEELER, J. ***“Mitochondrial phylogeography and demografic history. Implications for conservation”***. Heredity. 2007, p. 1-11.

- MOHAMED ALZOHAIY A.M. **PCR Techniques**. Department of Genetics. 2005, Zagazig University, Zagazig, Egypt.
- MOLINA GI. **“Sulla Storia Naturale del Chile”**. Tommaso d’Aquino, 1782, pag. 367.
- MORERA, L; DE ANDRES, D.F; BARBANCHO, M; GARRIDO, J.J; BARBA, C.J. **“Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano Español”**. Arch. Zootec. 1999, vol. 48. P. 63-70.
- NEI, M. **“Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations”**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973, vol. 70, n°. 12, p. 3321 – 3323.
- NEI, M. **“Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals”**. Genetics. 1978, n° 89, p. 583-590.
- NOLTE, M; KOTZE, A; VAN DER BANK; GROBLER, J.P. **“Microsatellite markers reveal low genetic differentiation among southern African Camelus dromedarius populations”**. South African Journal of Animal Science. 2005, vol. 35, p. 3.
- NORAMBUENA, M.C; PAREDES, M. **“Variabilidad y estructura Genética en dos poblaciones de Vicugna vicugna (Camelidae) del Norte de Chile”**. Revista Chilena de Historia Natural. 2003, n° 76, p. 99-104.

- NOVOA C. “**Genetic improvement of South American Camelids**”. Revista Brasileira de Genética. 1989, n°. 12, p. 123-135.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). “**Situación actual de los camélidos Sudamericanos en el Perú**”. Proyecto cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. 2005, TCP/RLA/2914.
- PARSONS, K.M. “**Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces**”. Molecular Ecology Notes. 2001, p. 341-344.
- PAUCAR, A; TELLEZ, J; NEYRA, L. and RODRIGUEZ, J. “**Estudio tecnológico del beneficio de vicuñas**”. In: F. Villiger, compilador. La Vicuña. Editorial Los Pinos, 1984, p. 33-48.
- PENEDO, M; CAETANO, A.R; CORDOVA K.I. “**Microsatellites markers for South American Camelids**”. Animal Genetics. 1998, n° 29, p. 411-412.
- POOLE, K.G; REYNOLDS, D.M; MOWAT, G; PAETKAU, D. “**Estimating mountain goat abundance using DNA from Fecal Pellets**”. The Journal of Wildlife Management. 2011, vol.75, n° 6, p. 1527-1534.
- RAYMOND, M; ROUSSET, F. “**GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism**”. J. Heredity. 1995, n° 86, p. 248-249.

- REED, D; FRANKHAM, R. ***“Correlation between Fitness and Genetic Diversity”***. Conservation Biology. 2003, vol. 17, n° 1, p. 230-237.
- SAKAMOTO, T; DANZMANN, R.G; GHARBI, K; HOWARD, P; OZAKI, A. ***“A microsatellite linkage map of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) characterized by large sex-specific differences in recombination rates”***. Genetics. 2000, vol. 155, p. 1331-1345.
- SOULSBURY, C,D; IOSSA, G; EDWARDS, K,J; BAKER, P.J; HARRIS, S. ***“Allelic dropout from a high-quality DNA source”***. Conservation Genetic. 2007, vol. 8, p. 733-738.
- SPENCER, PBS; WOOLNOUGH, AP. ***“Assesment and genetic characterization of Australian camels using microsatellite polymorphisms”***. Livestock Sciences. 2010, Vol. 129, p. 241-245.
- TABERLET, P; WAITS, L.P; LUIKART, J. ***“Noninvasive genetic sampling: look before you leap”***. Trends Ecol Evol. 1999, vol. 14, p. 323–327.

- TERIO, K.A; BROWN, J.L; MORELUND, R; MUNSON, L. ***“Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah”***. Zoo Biol. 2002, vol. 21, p. 215–22.
- THOMAS O. ***“Preliminary diagnosis of new mammals obtained by the Yale National Society Peruvian Expedition”***. Smithsonian Misc. 1917, C 68: 1-3.
- UFFO REINOSA, O. ***“Aplicación de Marcadores Moleculares en Ganadería”*** Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencia Veterinarias. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba, 2006.
- VILÁ, B. ***“La importancia de la etología en la conservación y manejo de las vicuñas”***. Etología, 1999, vol. 7, p. 63-68.
- VILÁ, B. ***“La Silvestría de las vicuñas, una característica esencial para su conservación y manejo”***. Ecología Austral. 2002, vol. 12, p. 79-82. Asociación Argentina de Ecología.
- YACOBACCIO, H; KILLIAN, L; VILÄ, B. ***“Explotación de las vicuñas durante el periodo colonial (1535-1810)”***. Trabajo presentado al III Taller Internacional “Manejo de Camélidos Sudamericanos: Perspectivas Arqueológicas, Antropológicas, Históricas y Biológicas”. 2003, Grupo Zoo arqueología de Camélidos, Tilcara.



- YAÑEZ AMAYO, V. ***Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de librerías genómicas enriquecidas de camote (Ipomoeabatatas)***. Asesor: Rolando Estrada. Tesis para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Genética, UNMSM. Facultad de ciencia Biológicas Unidad de Posgrado. Lima, 2002.
- YOU F.M, LUO M.C, GU Y.Q, LAZO G.R, DEAL K, DVORAK J, ANDERSON O.D. ***“GenoProfiler: batch processing of high-throughput capillary fingerprinting data”***. Bioinformatics. 2007, vol. 5, n° 23, p. 240-2.
- WEBB, D AND MEACHEN, J. ***“On the origin of Lamine Camelidae including a new genus from the late Miocene of the high plains”***. Bulletin of Carnegie Museum of Natural History. 2004, p. 349-362.
- WEHAUSEN, JD; RAMEY II RR; EPPS CW. ***“Experiments in DNA Extraction and PCR Amplification from Bighorn Sheep Feces: the Importance of DNA Extraction Method”***. Journal of Heredity. 2004, vol. 95, n° 6, p. 503-509.
- WHEELER J.C y HOCES D. ***Community participation, sustainable use, and vicuña conservation in Peru***. Mountain Research and Development. 1997, vol. 17, n° 3, p. 283-287.

- WHEELER J.C, FERNANDEZ M., ROSADIO R, HOCES D, KADWELL M. y BRUFORD M.W. ***Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú***. Rev. Inv Vet Perú: Suplemento. 2001, n° 1, p. 170-183.
- WRIGHT, S. ***“The genetical structure of populations”***. Ann. Eugen. 1951, n° 15, p. 323–353.